

PCT/JP03/00334

10/500834

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

17.01.03

07 JUL 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 5月23日

REC'D 14 MAR 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-149874

V PO

PCT

[ST.10/C]:

[JP2002-149874]

出願人

Applicant(s):

タカラバイオ株式会社

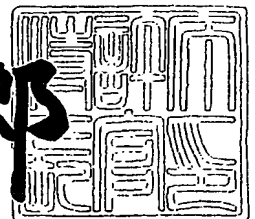
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3010601

【書類名】 特許願

【整理番号】 T-1765

【提出日】 平成14年 5月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C08B 37/00
C12N 9/00
C12P 19/00

【発明者】

【住所又は居所】 青森県弘前市品川町120-1 ライオンズマンション
品川町203号

【氏名】 酒井 武

【発明者】

【住所又は居所】 岩手県西磐井郡平泉町平泉字大平290-2

【氏名】 餘目 ひとみ

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会
社内

【氏名】 猪飼 勝重

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会
社内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 302019245

【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社

【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 173212

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

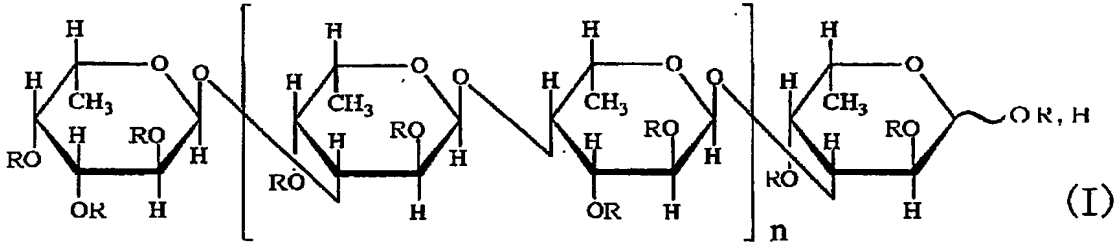
【書類名】 明細書

【発明の名称】 硫酸化フカン

【特許請求の範囲】

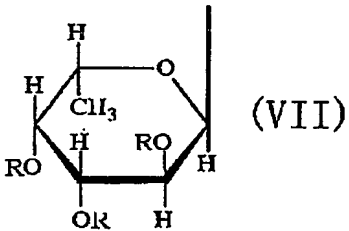
【請求項 1】 下記一般式 (I) で表される糖化合物又はその塩。

【化 1】



(式中、RはH又はSO₃H又はCH₃CO又は下記一般式(VII)である。
nは1以上の整数である。)

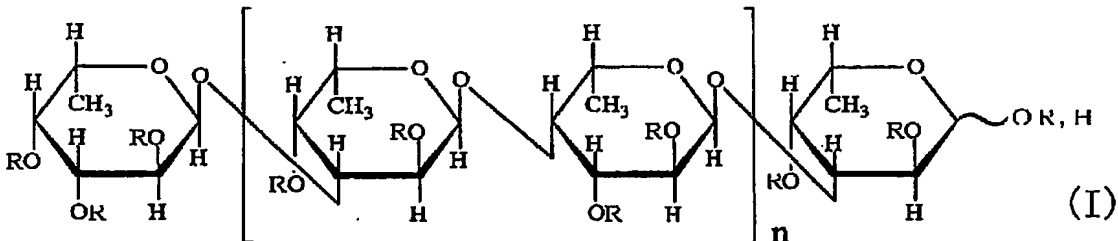
【化 2】



(式中、RはH又はSO₃H又はCH₃COである。)

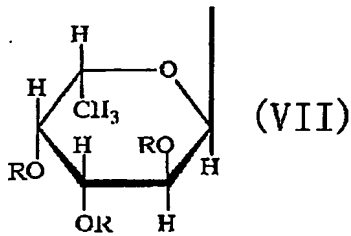
【請求項 2】 下記一般式 (I) で表される硫酸化フカンオリゴ糖又はその塩。

【化 3】



(式中、RはH又はSO₃H又はCH₃CO又は下記一般式(VII)である。
nは1~4の整数である。)

【化 4】



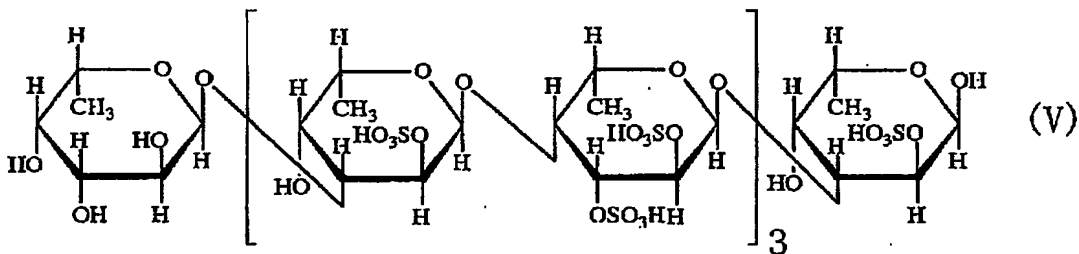
(式中、RはH又はSO₃H又はCH₃COである。)

【請求項3】 フコフィラス (*Fucophilus*) 属細菌の培養物から得られたヒバマタ目褐藻由来硫酸化フカン分解酵素群。

【請求項4】 下記の理化学的性質を有することを特徴とするエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼである請求項3記載の硫酸化フカン分解酵素：

(I) 下記式(V)で表される硫酸化フカンオリゴ糖に作用して、 α -(1-4) L-フコシル結合をエンド的に切断する；

【化 5】



(II) 約6~8の範囲に至適pHを有する；

(III) 約10~40℃に至適温度を有する；

【請求項5】 フコフィラス属細菌を培養し、その培養物から該酵素を採取することを特徴とする請求項3記載の硫酸化フカン分解酵素の製造方法。

【請求項6】 褐藻類由来硫酸化多糖画分に請求項3記載の硫酸化フカン分解酵素を作用させて得られる硫酸化フカンオリゴ糖。

【請求項7】 褐藻類由来硫酸化多糖画分に請求項3記載の硫酸化フカン分解酵素を作用させて取得することを特徴とする硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法。

【請求項8】 請求項3記載の硫酸化フカン分解酵素をヒバマタ目褐藻類由来硫

酸化多糖画分に作用させることを特徴とする請求項7記載の硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法。

【請求項9】 ヒバマタ目褐藻類が *Fucus vesiculosus* 又は *Ascophyllum nodosum* である、請求項8記載の硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【本発明の属する技術分野】

本発明は糖鎖工学分野において有用な硫酸化フカンを分解する酵素、該酵素の製造方法、並びに糖鎖工学用試薬として有用な硫酸化フカンオリゴ糖及びそれらの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

褐藻類には何種類もの硫酸化多糖が含まれている。これらの硫酸化多糖は硫酸化フカンあるいはフコイジンと総称されることが多いが、その構造は由来となる海藻により異なる。例えば、*Fucus vesiculosus*、ガゴメ、マコンブ、オキナワモズク、モズク、ワカメメカブそれぞれから抽出される硫酸化多糖は異なる構造を持つ。また、一般に一種の海藻から硫酸化多糖画分を調製すると、数種の分子種の硫酸化多糖が混在している。

【0003】

これまでに構造が決定された硫酸化多糖の分子種としては、硫酸化フカン、硫酸化フコグルクロノマンナン、硫酸化フコガラクトン、硫酸化グルクロノフカン等が挙げられる。硫酸化フカン画分には強い抗凝血活性、硫酸化フコグルクロノマンナン画分には癌細胞に対するアポトーシス誘導活性が報告されている等、硫酸化多糖は一般に何らかの生物活性を持つことが多い。そのため、硫酸化多糖を医薬品として開発する試みがなされている。

【0004】

硫酸化多糖を医薬品として開発する際、その構造を決定する必要が生じるが、その硫酸化多糖を分解する酵素を用いれば構造を決定する際に非常に有利である

。しかし褐藻類の硫酸化多糖を分解する酵素は市販されておらず、しかも褐藻類の硫酸化多糖は海藻の種によって異なるため、硫酸化多糖の構造を決めるにはその硫酸化多糖を特異的に分解する酵素が必要となる。

【0005】

*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンハ抗凝血作用、クラミジアの子宮表皮細胞への定着阻害作用、アレルギー反応抑制作用、移植臓器の拒絶抑制作用等を持つことが報告されている。これらの活性と構造の関係を解明するため*Fucus vesiculosus*や*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化フカンの構造が研究されているが、物理化学的な分析によりその平均的な構造が提唱されているもの、酸加水分解により一部のオリゴ糖を調製し構造を解明したものがあるに過ぎない。

また、*Fucus vesiculosus*や*Ascophyllum nodosum*から硫酸化フカン画分を調製すると、数種の分子種の硫酸化多糖が混在している。一般に、目的とする生物活性を担う分子種以外の硫酸化多糖は不必要であり、時には不必要な分子種が副作用を誘発させるだけの場合もある。

【0006】

また、構造的に均一な*Fucus vesiculosus*や*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化フカンのオリゴ糖を、再現性よく調製できれば生物活性と構造の関係を解明する際非常に有用である。例えば、褐藻類由来硫酸化多糖画分に含まれる硫酸化フカンを分解してオリゴ糖を生成させる酵素が知られているが、この酵素はコンブ目褐藻類の硫酸化フカンによく作用して硫酸化フカンオリゴ糖を生成させるが、*Fucus vesiculosus*や*Ascophyllum nodosum*等のヒバマタ目褐藻類の硫酸化フカンには作用しない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

以上のことから、ヒバマタ目褐藻類由来硫酸化多糖画分に含まれる分子種のそれぞれを特異的に分解する酵素、酵素的に製造した構造が均一なオリゴ糖、及びそれらの製造方法が求められていた。

すなわち、本発明の目的は、糖鎖工学的に有用なヒバマタ目褐藻類由来硫酸化フカン分解する酵素、該酵素の製造方法、及び硫酸化フカンに該酵素を作用させて得られるオリゴ糖及びその製造方法を提供することにある。

【0008】

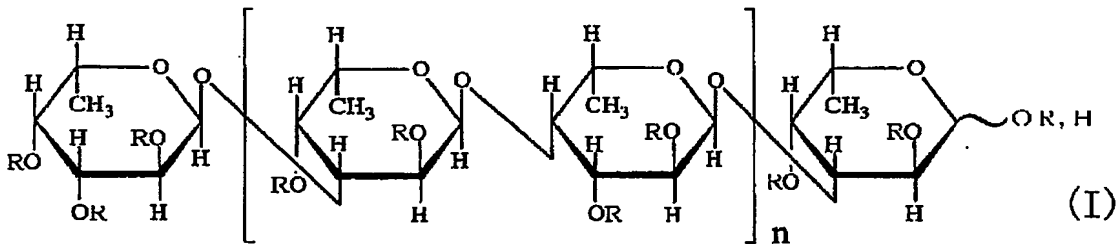
【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、フコフィラス属に属する細菌の1菌株、フコフィラス フコイダノリイティカス (*Fucophilus fcoidanolyticus*) SI-1234が、新規な硫酸化フカン分解酵素を生産することを見出し、該酵素の製造方法を見出した。また、該酵素を利用してヒバマタ目褐藻類由来硫酸化多糖画分から構造の均一な新規な硫酸化フカンオリゴ糖を製造できることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

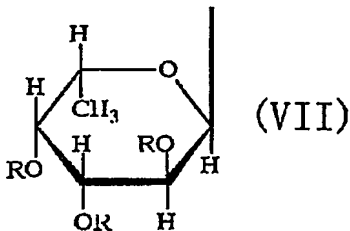
すなわち、本発明の第1の発明は、下記一般式(I)で表される糖化合物又はその塩に関する。

【化6】



(式中、RはH又はSO₃H又はCH₃CO又は下記一般式(VII)である。
nは1以上の整数である。)

【化7】

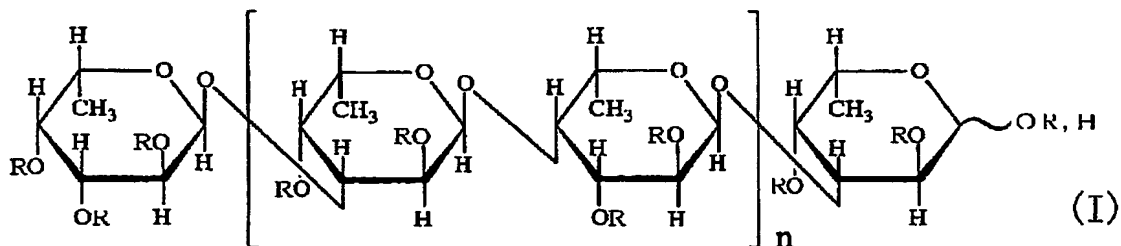


(式中、RはH又はSO₃H又はCH₃COである。)

【0010】

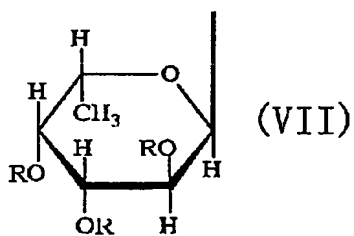
本発明の第2の発明は、下記一般式(1)で表される硫酸化フカンオリゴ糖又はその塩に関する。

【化8】



(式中、RはH又はSO₃H又はCH₃CO又は下記一般式(VII)である。
nは1~4の整数である。)

【化9】



(式中、RはH又はSO₃H又はCH₃COである。)

【0011】

本発明の第3の発明は、フコフィラス属細菌の培養物から得られた硫酸化フカン分解酵素群に関する。

本発明の第3の発明において、該酵素は、硫酸化フカン分解酵素生産能を有するフコフィラス属細菌を培養し、その培養物から採取することができる。

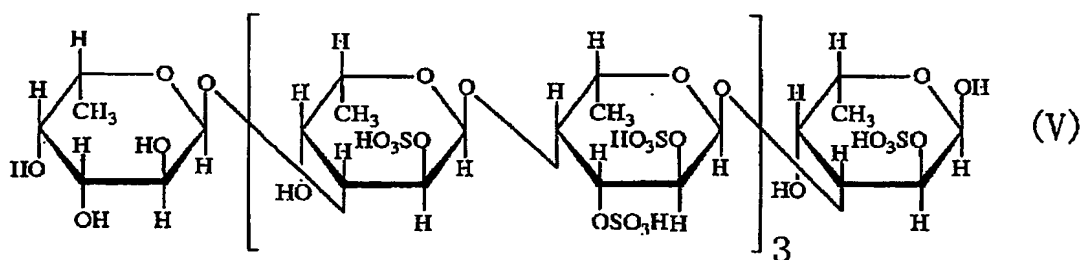
【0012】

本発明の第3の発明において、硫酸化フカン分解酵素は特に限定はされないが例えば、エンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ、エキソ型L-フコシダーゼ、硫酸化フカン低分子化酵素A、硫酸化フカンデアセチラーゼが含まれる。

エンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼとしては、下記の理化学的性質を有するものが例示される：

(I) 下記式 (V) で表される硫酸化フカンオリゴ糖に作用して、 α -(1-4) L-フコシル結合をエンド的に切断する；

【化10】



(II) 約6~8の範囲に至適pHを有する；

(III) 約10~40℃に至適温度を有する；

(IV) 分子量：ゲルろ過法にて測定した場合、約11万~13万である。

【0013】

エキソ型L-フコシダーゼは、下記の理化学的性質を有することを特徴とする

(I) 硫酸化フカンに作用して、L-フコース残基をエキソ的に切断する；

【0014】

硫酸化フカン低分子化酵素Aの理化学的性質は以下の通りである。

(I) 作用：硫酸化フカンに作用して、硫酸基を切断し、硫酸を遊離する（硫酸化フカンスルファターゼ）。硫酸化フカンの低分子化を促進する。

【0015】

硫酸化フカンデアセチラーゼの理化学的性質は以下の通りである。

(I) 作用：硫酸化フカンに作用して、酢酸を遊離する。硫酸化フカンの低分子化を促進する。

【0016】

本発明の第4の発明は、褐藻類由来硫酸化多糖画分に本発明の第3の発明の硫酸化フカン分解酵素を作用させて得られる硫酸化フカンオリゴ糖に関する。

本発明の第4の発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、褐藻類由来硫酸化多糖画分に本発明の第3の発明の硫酸化フカン分解酵素を作用させて取得することを特徴と

する硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法によって調製することができる。

【0017】

本発明の第4の発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、本発明の第3の発明の硫酸化フカン分解酵素をヒバマタ目褐藻類由来硫酸化多糖画分に作用させることを特徴とする硫酸化フカンオリゴ糖の製造方法によって調製することができる。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下本発明に関して具体的に説明する。

本発明にの糖化合物を得るための原料としては、特に限定されるものではないが、例えば、*Fucus vesiculosus*、*Ascophyllum nodosum*等ヒバマタ目の褐藻類由来の硫酸化フカンが使用できる。該ヒバマタ目褐藻類は本発明の糖化合物の生産効率が高く原料として好適である。

【0019】

本発明の硫酸化フカン分解酵素とは、褐藻類由来硫酸化フカンに作用して還元性末端にフコースを持つオリゴ糖を生成させる酵素である。

【0020】

本発明の硫酸化フカン由来オリゴ糖は、硫酸化フカンに本発明の硫酸化フカン分解酵素を作用させて得られるオリゴ糖で、還元性末端糖がフコースである。

【0021】

本発明で使用する硫酸化フカンを製造する際にはまず、褐藻類を水性溶媒で抽出し、硫酸化多糖画分を得る。その際硫酸化フカンの低分子化を防ぐためには、pHは4～9、温度は100℃以下が好ましい。また、上記硫酸化多糖画分中のアミノ酸や低分子性の色素等は限外ろ過で効率良く除去できる。疎水性物質の除去には活性炭処理等も有効である。

このようにして褐藻類の硫酸化多糖画分を得ることができる。該硫酸化多糖画分、硫酸化フカンを含む画分である硫酸化フカン画分、硫酸化フカンのいずれもが本発明の硫酸化フカン分解酵素の基質として使用できる。該画分を陰イオン交換カラムで分離すればより純度の高い硫酸化フカンを得られる。上記の硫酸化多糖画分も陰イオン交換カラムで精製した硫酸化フカンもともに本発明の硫酸

化フカン分解酵素を精製する際の活性測定用基質、及び硫酸化フカンオリゴ糖製造時の原料として使用できる。

【0022】

本発明の硫酸化フカン分解酵素の製造に使用される細菌としては、硫酸化フカン分解酵素を生産する細菌であれば特に限定はないが例えば、フコフィラス フコイダノリティカス (*Fucophilus fucoidanolyticus*) SI-1234 株が挙げられる。

なお、上記のフコフィラス フコイダノリティカス SI-1234 株はナマコの腸内より本発明者らが新たに検索して得た細菌で、その菌学的性質は次のとおりである。

a. 形態的性質

本菌は直径 1.2~1.6 μm の球菌である。

胞子の有無 なし

グラム染色性 陰性

b. 生理的性質

(1) 生育温度 25℃で生育する。

(2) 酸素に対する態度 好気性

(3) カタラーゼ 陽性

(4) オキシダーゼ 陰性

(5) 塩類要求性

0%食塩培地での生育 陰性

1%食塩培地での生育 陰性

海水培地での生育 陽性

(6) キノン系 メナキノン7

(7) 菌体内DNAのGC含量 52%

(8) OF-テスト 酸を生成しない

(9) 集落の色調 特徴的な集落色素を生成せず

(10) 運動性 陰性

(11) 滑走性 陰性

(12) 鞭毛 なし

【0023】

本菌株は、バーグーズ マニュアル オブ ディターミネイティブ バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)、第9巻(1994)に記載の基本分類によればグループ4 (グラム陰性好気性桿菌及び球菌) に分類される。しかし本菌株は、電子伝達鎖にメナキノン7を有し、GC含量が52%という点でグループ4に属する菌と大いに異なる。

【0024】

そこで、本菌株の16S rRNAをコードするDNAの塩基配列を決定し、既知の細菌と相同性を比較したところ16S rRNAをコードするDNAの全域(約1500塩基)にわたって相同性の高い既知菌株は存在しなかった。16S rRNAをコードするDNAの全配列の相同性が90%以下の場合、両細菌の属が同じであることはない。一方DNAデータベースに登録されている16S rRNAをコードするDNAの配列をもとに、系統樹を作成したところ、本菌株と類縁の細菌は総てVerrucomicrobiaに属するものであった。そこで、本発明者らは、遺伝子的分類において本菌株はVerrucomicrobiaの新属の細菌であると断定したが、菌学的分類によってフコフィラス フコイダノリティカス SI-1234と命名した。

なお、上記菌株はFucophilus fucoidanolyticus SI-1234と表示され、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-17517として平成11年8月18日(原寄託日)より寄託され、ブダペスト条約に基づき上記独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM BP-7495として平成13年3月7日(移管日)より寄託されている。

【0025】

本菌株の16S rRNAをコードするDNAの配列を配列表の配列番号1に記載する。従って、16S rRNAをコードするDNAの配列より、フコフィラス フコイダノリティカス SI-1234と同属と判断される細菌から得られた硫酸化フカン分解酵素も本発明の硫酸化フカン分解酵素に含まれる。

【0026】

本発明の硫酸化フカン分解酵素を生産する細菌を培養するにあたり、培地に加える栄養源は使用する微生物が利用し、該酵素を生産するものであればよく、炭素源としては、例えば、硫酸化フカン、*Fucus vesiculosus* や *Ascophyllum nodosum* 等の海藻、アルギン酸、ラミナラン、フコース、グルコース、マンニトール、グリセロール、サッカロース、マルトース、デンプン等が利用でき、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、コーンステープリカー、肉エキス、脱脂大豆、硫酸、塩化アンモニウム、尿素、尿酸等が適当である。その他にナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛等の塩化物、リン酸塩、硫酸塩等を加えてもよい。なお、一般に海水から採取した微生物は、海水あるいは市販の人工海水中で極めて生育し易い。

また、培養条件は使用する微生物、培地組成等に応じ、本発明の硫酸化フカン分解酵素の生産量が最大になるように設定するが、一般に培養温度は15～30℃、培地のpHは5～9がよく、5～72時間の通気攪拌培養で本発明の硫酸化フカン分解酵素の生産量は最高に達する。培養終了後、遠心分離で菌体と培養上清に分画し、それぞれから本発明の硫酸化フカン分解酵素を得ることができる。

【0027】

上記のフコフィラス フコイダノリイティカス SI-1234 を適当な培地で培養し、その菌体を集め、通常の細胞破碎手段、例えば超音波処理で菌体を破碎すると無細胞抽出液が得られる。次いでこの抽出液から通常の精製手段により、硫酸化フカン分解酵素を精製することもできる。例えば、塩析、イオン交換カラムクロマト、疎水カラムクロマト、ゲルろ過等により精製した本発明の硫酸化フカン分解酵素を得られる。また、上述の培養上清中にも本発明の硫酸化フカン分解酵素が存在するので、菌体内酵素と同様の精製手段で精製できる。本発明の硫酸化フカン分解酵素は、少なくとも以下の4種類の酵素、エンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ、エキソ型L-フコシダーゼ、硫酸化フカン低分子化酵素A、硫酸化フカンデアセチラーゼを含む。

【0028】

本発明の硫酸化フカン分解酵素の理化学的性質は以下の通りである。

(I) 作用：硫酸化フカンに作用して、フコースを還元性末端に持つオリゴ糖を生成させる。

(II) 至適 pH：本酵素の至適 pH は 7.0 ~ 8.5 付近にある (図 1)。

すなわち図 1 は本酵素の反応時の pH と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性 (%)、横軸は pH を示す。

(III) 至適温度：本酵素の至適温度は約 30 ~ 40 °C 付近にある (図 2)。

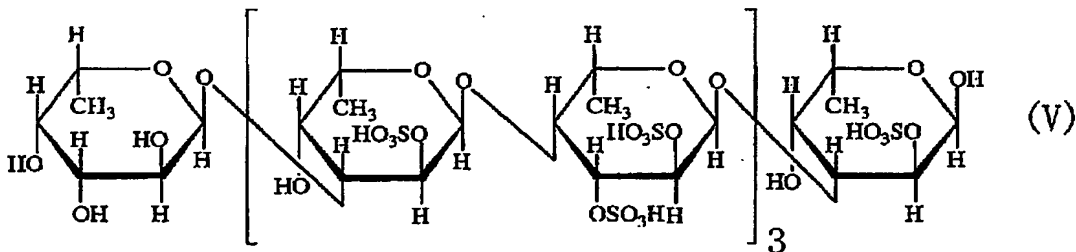
すなわち、図 2 は本酵素の反応時の温度と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性 (%)、横軸は温度 (°C) を示す。

【0029】

本発明の硫酸化フカン分解酵素の一例であるエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの理化学的性質は以下の通りである。

(I) 下記式 (V) で表される硫酸化フカンオリゴ糖に作用して、 α -(1-4) L-フコシル結合をエンド的に切断する；

【化 11】



(II) 至適 pH：本酵素の至適 pH は 6 ~ 8 付近にある (図 18)。

すなわち図 18 は本酵素の反応時の pH と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性 (%)、横軸は pH を示す。

(III) 至適温度：本酵素の至適温度は約 10 ~ 40 °C 付近にある (図 19)。

すなわち、図 18 は本酵素の反応時の温度と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性 (%)、横軸は温度 (°C) を示す。

(IV) 分子量：ゲルろ過法にて測定した場合、約 11 万 ~ 13 万である。

【0030】

本発明の硫酸化フカン分解酵素の一例であるエキソ型L-フコシダーゼの理化学的性質は以下の通りである。

(I) 作用：硫酸化フカンに作用して、L-フコース残基をエキソ的に切断する。

【0031】

本発明の硫酸化フカン分解酵素の一例である硫酸化フカン低分子化酵素Aの理化学的性質は以下の通りである。

(I) 作用：硫酸化フカンに作用して、硫酸基を切断し、硫酸を遊離する（硫酸化フカンスルファターゼ）。硫酸化フカンの低分子化を促進する。

【0032】

本発明の硫酸化フカン分解酵素の一例である硫酸化フカンデアセチラーゼの理化学的性質は以下の通りである。

(I) 作用：硫酸化フカンに作用して、酢酸を遊離する。硫酸化フカンの低分子化を促進する。

【0033】

本発明の硫酸化フカン分解酵素は、硫酸化フカン分解活性を測定して確認でき、生産菌の無細胞抽出液でも、各種カラムクロマトで精製後の酵素溶液でも確認できる。

【0034】

フコフィラス フコイダノリティカスSI-1234株は硫酸化フカンを資化する微生物であり、硫酸化フカンを分解するために菌体内及び菌体外に本発明の硫酸化フカン分解酵素を生産する。

【0035】

本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、本発明の硫酸化フカン分解酵素を硫酸化フカン、若しくは硫酸化フカン含有物に作用させて調製できる。硫酸化フカン含有物としては、例えば硫酸化フカンの部分精製品、褐藻類由来硫酸化多糖画分、褐藻類の水溶性抽出物、若しくは褐藻類藻体が好適に使用できる。

本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を調製する際、硫酸化フカン、若しくは硫酸化

フカン含有物の溶解は定法で行えばよく、溶解液中の硫酸化フカン、若しくは硫酸化フカン含有物はその最高溶解濃度でもよいが、通常はその操作性、反応に使用する本発明の硫酸化フカン分解酵素の量等を考慮して選定すればよい。硫酸化フカンの溶解液としては、水、緩衝液等より目的に応じて選択すればよい。溶解液のpHは通常中性付近で、酵素反応は通常30℃付近で行う。反応に使用する本発明の硫酸化フカン分解酵素の使用量、反応液の組成、反応時間等の調整により、硫酸化フカンオリゴ糖の分子量を調整できる。この様にして得られた本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を分子量分画あるいは陰イオン交換カラムで分画して、更に均一な分子量の本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を調製できる。分子量分画は定法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法を使用すればよい。低分子化物は、必要に応じて更にイオン交換樹脂処理、活性炭処理等の精製操作を行ってもよく、必要に応じて脱塩処理、無菌処理、凍結乾燥処理もできる。これらの方法で、後述のごとく、NMR分析で構造決定可能な均一な構造の本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を得られる。

【0036】

本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、硫酸基を分子中に有しており、該基は種々の塩基と反応し、塩を形成する。本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、塩になった状態が安定であり、通常ナトリウム及び／又はカリウム及び／又はカルシウム等の塩の形態で提供される。これらの物質の塩はダウエックス50W等の陽イオン交換樹脂を利用して遊離の本発明の硫酸化フカンオリゴ糖に導ける。また、これらは、必要に応じ公知慣用の塩交換を行い所望の種々の塩に交換できる。

【0037】

本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は、薬学的に許容される塩、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム、亜鉛等のアルカリ土類金属、アンモニア等の塩とすることができる。

【0038】

本発明の硫酸化フカン分解酵素は硫酸化フカンを低分子化するため硫酸化フカンの構造解析に使用できる。また、本発明の硫酸化フカンオリゴ糖は糖鎖工学用試薬として使用できる。例えば、特公平5-65108号公報記載の方法により

2-アミノピリジル化(PA化)を行い、後述のごとく該オリゴ糖のPA化物を調製すれば、種々の硫酸化フカン分解酵素の基質として使用できるなど糖鎖工学用試薬として極めて有用な物質を提供できる。また、本発明の硫酸化フカンオリゴ糖を抗原として、抗体を作製することができ、該抗体は硫酸化多糖の構造の特定に使用できる。

【0039】

【実施例】

以下に本発明を実施例をもって具体的に示すが、本発明は以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

【0040】

参考例1 *Fucus vesiculosus*由来硫酸化多糖画分の調製

乾燥した*Fucus vesiculosus*藻体を粉碎し、その1kgを10リットルの80%エタノールに懸濁し、25℃で3時間攪拌後ろ過、洗浄し残さを得た。その残さを30リットルの100mM塩化ナトリウムを含む30mMリン酸緩衝液(pH6.5)中に懸濁し、95℃で2時間処理後、30℃に冷却し、100gの活性炭、3000Uのアルギン酸リアーゼ(ナガセ生化学工業製)、及び3.75リットルのエタノールを添加し24時間攪拌後、遠心分離して上清を得た。その上清を排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機で4リットルに濃縮後、100mM塩化ナトリウムで溶媒を置換した。この溶液を4℃まで冷却し、0.5N塩酸でpHを2.0とし、生じた沈殿を遠心分離で除去し、上清を得た。その上清のpHを1N水酸化ナトリウムで8.0とし、上記の限外ろ過機で2リットルに濃縮後、20mM塩化ナトリウムで溶媒を置換し、遠心分離で不溶物を除去後、凍結乾燥して80gの*Fucus vesiculosus*由来硫酸化多糖画分を得た。

【0041】

参考例2 *Ascophyllum nodosum*由来硫酸化多糖画分の調製

市販の*Ascophyllum nodosum*粉末1kgから、参考例1の方法で100gの*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化多糖画分を得た。

【0042】

参考例3 ガゴメコンブ由来硫酸化多糖画分の調製

市販の乾燥ガゴメコンブをカッターミル（増幸産業製）で破碎してチップとし、1kgのチップから、参考例1の方法で38gのガゴメコンブ由来硫酸化多糖画分を得た。

【0043】

参考例4 *Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン画分の調製

7gの参考例1記載の*Fucus vesiculosus*由来硫酸化多糖画分を700mlの100mM塩化ナトリウムを含む20mMイミダゾール塩酸緩衝液（pH6.0）に溶解し、同緩衝液で平衡化させた5リットルのDEAE-セルロファインA-800にかけた。試料を流した後、10リットルの同緩衝液で洗浄し、100～1600mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、分取（500ml）した。各画分に含まれる総糖量をフェノール硫酸法で、総ウロン酸量をカルバゾール硫酸法で測定した。溶出塩化ナトリウム濃度700～800mMの画分を、限外ろ過（排除分子量10万）で濃縮、脱塩後凍結乾燥し、1.0gの*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン画分を得た。

【0044】

参考例5 *Ascophyllum nodosum*由来硫酸化フカン画分の調製

7gの参考例2記載の*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化多糖画分から、参考例4の方法で1.1gの*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化フカン画分を得た。

【0045】

参考例6 硫酸化フカン分解酵素活性測定方法

本発明の硫酸化フカン分解酵素は硫酸化フカンに作用して硫酸化フカンを低分子化させる。これを利用して下記の方法で硫酸化フカン分解酵素の活性を測定した。また、本発明の硫酸化フカン分解酵素は*Fucus vesiculosus*及び*Ascophyllum nodosum*由来硫酸化フカンに作用するが、活性測定には*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンを基質に用いた。

【0046】

すなわち、2.5%の濃度になるように溶解した参考例4記載の*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン画分溶液4.8 μ l、60 μ lの50mMイミダゾール

ル-塩酸緩衝液 (pH 7.8)、6 μ l の 1M 塩化カルシウム、9 μ l の 4M 塩化ナトリウム、28.2 μ l の水、及び 12 μ l の本発明の硫酸化フカン分解酵素とを混合し、30℃で3時間反応させた後、反応液を100℃で10分間処理し、HPLCで分析した。対照として、本発明の硫酸化フカン分解酵素の代わりに、その酵素溶液の溶媒を用いて反応させたもの及び硫酸化フカン画分の代わりに水を用いて反応させたものを同様に分析した。HPLCの分析は下記の様に行った。

【0047】

カラム Shodex SB-806HQ

カラム温度 25℃

溶離液 5 mM アジ化ナトリウムを含む 50 mM 塩化ナトリウム

流速 1 ml / 分

検出 示差屈折率検出器

【0048】

1 単位の硫酸化フカン分解酵素活性は上記反応系において1分間に1 μ mol のフコシル結合を切断する酵素量とした。切断したフコシル結合の量は下記式により求めた。

$$Fd \times (Sm / Pm - 1) / (Sm \times 180 \times 0.01) = U / ml$$

Fd : 反応に用いた硫酸化フカン量 (μ g)

Sm : 基質硫酸化フカンの平均分子量

Pm : 反応後の硫酸化フカンの平均分子量

180: 反応時間 (分)

0.01: 酵素液量 (ml)

また、タンパク質の定量は、酵素液の280 nmの吸光度を測定することにより行い、その際1 mg/mlのタンパク質溶液の吸光度を1.0として計算した。

【0049】

実施例 1 硫酸化フカン分解酵素の調製

フコフィラス フコイダノリイティカス (*Fucophilus fcoidanolyticus*) SI-1234 を、参考例 1 に記載の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化多糖画分 0.2% とペプトン 1% を含む人工海水 (ジャマリンラボラトリー製) pH 8.0 からなる培地 600 ml を 120℃、20 分間オートクレーブ処理した培地に接種し、24℃ で 72 時間培養して種培養液とした。参考例 1 に記載の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化多糖画分 0.2%、ペプトン 1%、及び消泡剤 (KM70、信越化学工業製) を含む人工海水 (ジャマリンラボラトリー製) pH 8.0 からなる培地 20 リットルを 30 リットルのジャーファーマンターに入れ、120℃、20 分間オートクレーブ処理した培地に、上記の種培養液を接種し、毎分 125 回転の回転速度で、24℃ で 48 時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。

【0050】

この菌体を 700 ml の 250 mM 塩化ナトリウムと 10 mM 塩化カルシウムを含む 10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して上清を得た。この上清を同じ緩衝液で充分透析し、遠心分離して上清、すなわち、本発明の硫酸化フカン分解酵素粗酵素溶液を得た。

【0051】

なお、上記の培養上清と粗酵素溶液に含まれる、硫酸化フカン分解酵素活性を参考例 6 記載の方法で測定した結果、培養液上清には培地 1 ml あたり 0.05 mU、菌体抽出液には培地 1 ml あたり 0.05 mU の活性が検出された。

【0052】

上記の硫酸化フカン分解酵素粗酵素溶液を限外ろ過により溶媒を 10 mM 塩化カルシウム、30 mM 塩化ナトリウム、5 mM アジ化ナトリウムを含む 10 mM のイミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に交換し、同緩衝液で平衡化させた 500 ml の DEAE-セルロファイブ A-800 にかけた。すなわち、酵素溶液を添加後、上記緩衝液で充分洗浄し、30 mM から 350 mM の塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は 1 本あたり 51 ml とした。

各フラクションの硫酸化フカン分解酵素活性を測定し、活性画分のうち、塩化ナトリウム濃度 60~140 mM で溶出された画分を DEAE-1 画分、塩化ナ

トリウム濃度140～230 mMで溶出された画分をDEAE-2画分とした。

【0053】

上記のDEAE-1画分を10 mM 塩化カルシウム、100 mM 塩化ナトリウム、5 mM アジ化ナトリウムを含む10 mMのイミダゾール-塩酸緩衝液（pH7.0）で平衡化させた200 mlの硫酸化セルロファイン（生化学工業）にかけた。すなわち、酵素溶液を添加後、上記緩衝液で充分洗浄し、100 mMから600 mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は1本あたり20 mlとした。

【0054】

各フラクションの硫酸化フカン分解酵素活性を測定し、活性画分のうち、塩化ナトリウム濃度290～370 mMで溶出された画分をDEAE-1S画分とした。

【0055】

上記のDEAE-2画分を10 mM塩化カルシウム、200 mM 塩化ナトリウム、5 mM アジ化ナトリウムを含む10 mMのイミダゾール-塩酸緩衝液（pH7.0）で平衡化させた200 mlの硫酸化セルロファイン（生化学工業）にかけた。すなわち、酵素溶液を添加後、上記緩衝液で充分洗浄し、200 mMから1500 mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は1本あたり20 mlとした。

【0056】

各フラクションの硫酸化フカン分解酵素活性を測定し、活性画分のうち、塩化ナトリウム濃度240～350 mMで溶出された画分をDEAE-2S画分とした。

【0057】

実施例2 硫酸化フカン分解酵素粗酵素溶液を用いた硫酸化フカンオリゴ糖の調製、精製、及び構造解析

(1) 基質の調製

乾燥した*Fucus vesiculosus*薬体60 gを粉碎し、1リットルの80%エタノールに懸濁し、2時間攪拌後、ろ過し、残さを充分洗浄した。得られた残さに対

して上記の洗浄工程をさらに2回行い、洗浄残さを得た。この洗浄残さに4リットルの50 mM 塩化カルシウム、400 mMの塩化ナトリウム、及び10% エタノールを含む20 mMのイミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁後、24時間攪拌し、遠心分離により*Fucus vesiculosus*抽出液を得た。

【0058】

得られた*Fucus vesiculosus*抽出液に上記の抽出用緩衝液を加えながら、排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により限外ろ過し、低分子物質を除去した。最終的に320 mlとし、遠心分離により沈殿を除去した。こうして、*Fucus vesiculosus*高分子画分を得た。

【0059】

(2) 硫酸化フカンオリゴ糖の調製

実施例2-(1)記載の*Fucus vesiculosus*高分子画分全量に実施例1記載のDEAE-1S画分(硫酸化フカン分解酵素活性として1.78 mU)及びDEAE-2S画分(硫酸化フカン分解酵素活性として1.97 mU)を混合し、25℃で5日間反応させた後、実施例1記載のDEAE-1S画分(硫酸化フカン分解酵素活性として1.54 mU)及びDEAE-2S画分(硫酸化フカン分解酵素活性として1.70 mU)を混合し、25℃で13日間反応させた。

反応液を排除分子量1万のホロファイバーを装着させた限外ろ過装置にかけ、分子量1万以下のオリゴ糖画分を回収し、硫酸化フカンオリゴ糖混合物1とした。

【0060】

(3) 硫酸化フカンオリゴ糖の精製

実施例2-(2)で得られた硫酸化フカンオリゴ糖混合物1に水を加え、10 mMとなるようにイミダゾールを、10 mMとなるように塩化ナトリウムを添加し、10 mM塩化ナトリウムを含む10 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した500 mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、1リットルの同じ緩衝液で洗浄後、10~1200 mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、1本あたり50 mlで分取した。各フラクションの総糖量をフェノール-硫酸法で測定した。その結果、5種のピークが存在していた

のでそれぞれのピーク部分を集めオリゴ糖1-(1)から1-(5)画分とした。

【0061】

オリゴ糖1-(1)～1-(3)画分をそれぞれ、エバポレーターで40mlに濃縮後、10%エタノールで平衡化させたセルロファインGCL-25のカラム(4.1×90.5cm)にかけ、10%エタノールで溶出して脱塩した。オリゴ糖1-(1)及び1-(2)はそのまま凍結乾燥により乾固した。こうして15mg及び75mgの本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(1)及び1-(2)を得た。

【0062】

脱塩したオリゴ糖1-(3)画分を集め、10mMとなるようにイミダゾールを、200mMとなるように塩化ナトリウムを加え、pHを6とした。このオリゴ糖溶液を200mM 塩化ナトリウムを含む10mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した100mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、300mlの同じ緩衝液で洗浄後、200～700mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、1本あたり10mlで分取した。各フラクションの総糖量をフェノール-硫酸法で測定した。その結果、溶出塩濃度430mMから480mMの画分に分子量が均一なオリゴ糖が存在していたのでその画分を集めた。この画分をエバポレーターで40mlに濃縮後、10%エタノールで平衡化させたセルロファインGCL-25のカラム(4.1×90.5cm)にかけ、10%エタノールで溶出して脱塩した。脱塩したオリゴ糖溶液を凍結乾燥により乾固した。こうして35mgの本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(3)を得た。

【0063】

オリゴ糖1-(4)画分に水を加え、300mMの塩化ナトリウムを含む10mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH6)と伝導率を同じにした。このオリゴ糖溶液を300mM 塩化ナトリウムを含む10mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した50mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、100mlの同じ緩衝液で洗浄後、300～800mMの塩化

ナトリウム濃度勾配で溶出させ、1本あたり4.9mlで分取した。各フラクションの総糖量をフェノール-硫酸法で測定した。その結果、溶出塩濃度450mMから630mMの画分に分子量が均一なオリゴ糖が存在していたのでその画分を集めた。この画分をエバポレーターで40mlに濃縮後、10%エタノールで平衡化させたセルロファインGCL-25のカラム(4.1×90.5cm)にかけ、10%エタノールで溶出して脱塩した。脱塩したオリゴ糖溶液を凍結乾燥により乾固した。こうして112mgの本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)を得た。

【0064】

オリゴ糖1-(5)画分に水を加え、400mMの塩化ナトリウムを含む10mMイミダゾール-塩酸緩衝液(pH6)と伝導率を同じにした。このオリゴ糖溶液を400mM塩化ナトリウムを含む10mMイミダゾール-塩酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した100mlのDEAE-セルロファインA-800のカラムにかけ、200mlの同じ緩衝液で洗浄後、400~900mMの塩化ナトリウム濃度勾配で溶出させ、1本あたり10mlで分取した。各フラクションの総糖量をフェノール-硫酸法で測定した。その結果、溶出塩濃度640mMから700mMの画分に分子量が均一なオリゴ糖が存在していたのでその画分を集めた。この画分をエバポレーターで40mlに濃縮後、10%エタノールで平衡化させたセルロファインGCL-25のカラム(4.1×90.5cm)にかけ、10%エタノールで溶出して脱塩した。脱塩したオリゴ糖溶液を凍結乾燥により乾固した。こうして44mgの本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(5)を得た。

【0065】

(4) 構造解析

実施例2-(3)で得られた本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(1)~(5)を2-アミノピリジンで蛍光標識し、還元末端糖及び糖組成の分析を行ったところ、本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(1)~(5)の還元性末端糖は総てフコースであった。また、中性糖組成も、総てフコースのみからなるものであった。次に、硫酸含量(塩化バリウムを用いた比濁法による)を測定し、質量分析

装置 (API-III、パーキンエルマー・サイエクス社製) で質量を分析した。また、JNM- α 500型核磁気共鳴装置 (日本電子社製) 及びDigital NMR ADVANCE 600 (Bruker Analytik社製) でNMR分析を行った。分析試料は定法により重水で置換後、構造解析を行った。構成糖の結合様式は、 ^1H -検出異種核検出法であるHMBC法を用いて行った。 ^1H -NMRの帰属にはDQF-COSY法及びHOHAHA法を、 ^{13}C -NMRの帰属にはHSQC法を用いた。以下に本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(1)~(5)の物性を示す。

【0066】

(a) 本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(1)の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトルを図3に、 ^{13}C -NMRスペクトルを図4に、マススペクトルを図5にそれぞれ示した。図3、4において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図5において、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量; 842

MS m/z ; 431.1, $[\text{M}+\text{Na}^+-2\text{H}^+]^{2-}$; 885.2, $[\text{M}+2\text{Na}^+-3\text{H}^+]^{-}$

^1H -NMR及び ^{13}C -NMRによる分析結果を表1、2に示す。

【0067】

【表1】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F1-1	5.43, d, 4.0	91.3
F1-2	4.45, m	74.3
F1-3	3.99, dd, 3.5, 10.0	73.5
F1-4	4.02, d, 3.5	69.5
F1-5	4.16, q, 6.5	66.8
F1-6	1.18, d, 6.5	16.3
F2-1	5.29, d, 3.0	95.0
F2-2	4.44, m	76.2
F2-3	4.11, m	68.2
F2-4	3.93, d, 3.0	83.3
F2-5	4.46, m	68.5
F2-6	1.32, d, 6.5	16.4

【0068】

【表 2】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	$^1\text{H-NMR}$ ケミカルシフト値、多重度、結合定数	$^{13}\text{C-NMR}$
F3-1	5.21, d, 3.5	99.9
F3-2	4.51, dd, 3.5, 10.5	74.3
F3-3	4.13, m	72.6
F3-4	4.04, d, 3.0	69.8
F3-5	4.38, m	68.2
F3-6	1.18, d, 6.5	16.2
F4-1	5.00, d, 4.0	96.5
F4-2	3.73, dd, 4.0, 10.5	68.9
F4-3	3.90, dd, 3.5, 10.5	70.3
F4-4	3.77, d, 3.5	72.9
F4-5	4.41, m	67.8
F4-6	1.15, d, 6.5	16.2

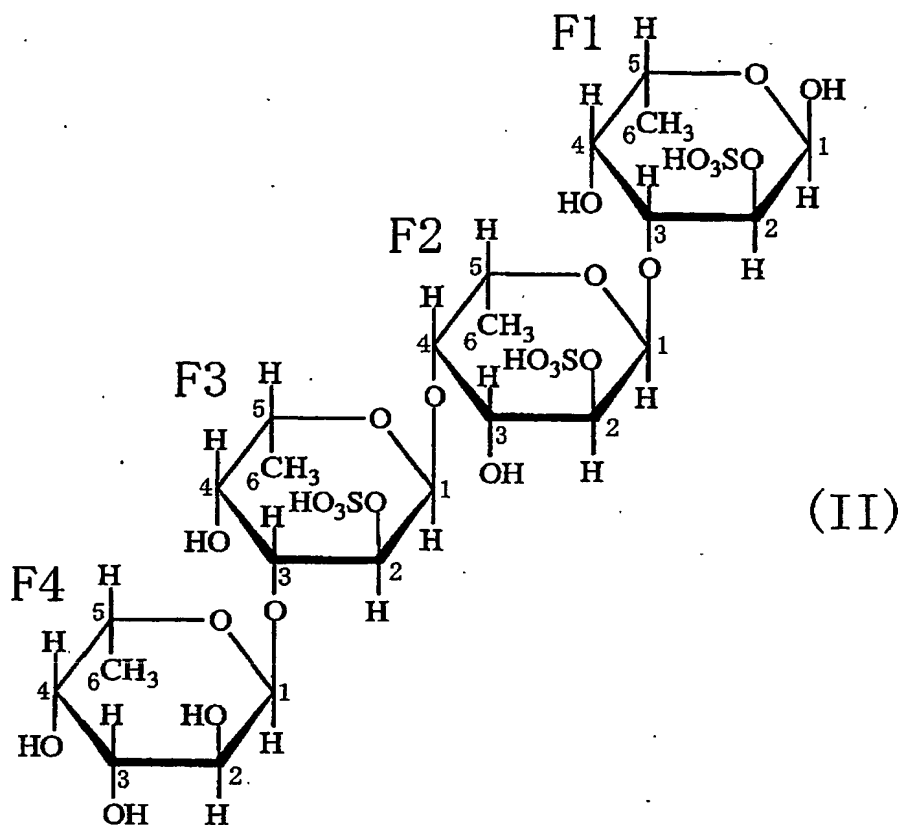
【0069】

糖組成 L-フコース 4 分子

硫酸基 3 分子

なお、 $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ におけるピークの帰属の番号は下記式 (I I) の通りである。

【化12】



【0070】

(b) 本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(2)の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトルを図6に、 ^{13}C -NMRスペクトルを図7に、マススペクトルを図8にそれぞれ示した。図6、7において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図8において、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量；922

MS m/z ; 482. 1, $[\text{M} + 2\text{Na}^+ - 4\text{H}^+]^{2-}$; 987. 1, $[\text{M} + 3\text{Na}^+ - 4\text{H}^+]^-$

$^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ による分析結果を表3、4に示す。

【0071】

【表3】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	$^1\text{H-NMR}$ ケミカルシフト値、多重度、結合定数	$^{13}\text{C-NMR}$
F1-1	5.43, d, 3.5	91.4
F1-2	4.46, dd, 3.9, 10.4	74.2
F1-3	3.99, dd, 3.1, 10.4	74.64 or 74.68
F1-4	4.02, d, 2.5	69.99 or 70.02
F1-5	4.16, m	66.8
F1-6	1.17, d, 6.5	16.3
F2-1	5.30, d, 3.8	96.0
F2-2	4.58, dd, 3.6, 11.0	73.3
F2-3	4.78, dd, 2.7, 10.9	74.64 or 74.68
F2-4	4.21, d, 2.9	80.0
F2-5	4.49, m	68.7
F2-6	1.32, d, 6.5	16.4

【0072】

【表4】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F3-1	5.21, d, 3.4	99.5
F3-2	4.49, m	74.2
F3-3	4.14, m	72.5
F3-4	4.02, d, 2.5	69.99 or 70.02
F3-5	4.39, m	68.0
F3-6	1.22, d, 6.0	16.18
F4-1	5.00, d, 4.0	96.4
F4-2	3.72, dd, 4.0, 10.0	69.0
F4-3	3.90, dd, 3.0, 10.0	70.3
F4-4	3.75, d, 3.0	72.9
F4-5	4.41, m	67.7
F4-6	1.14, d, 6.5	16.17

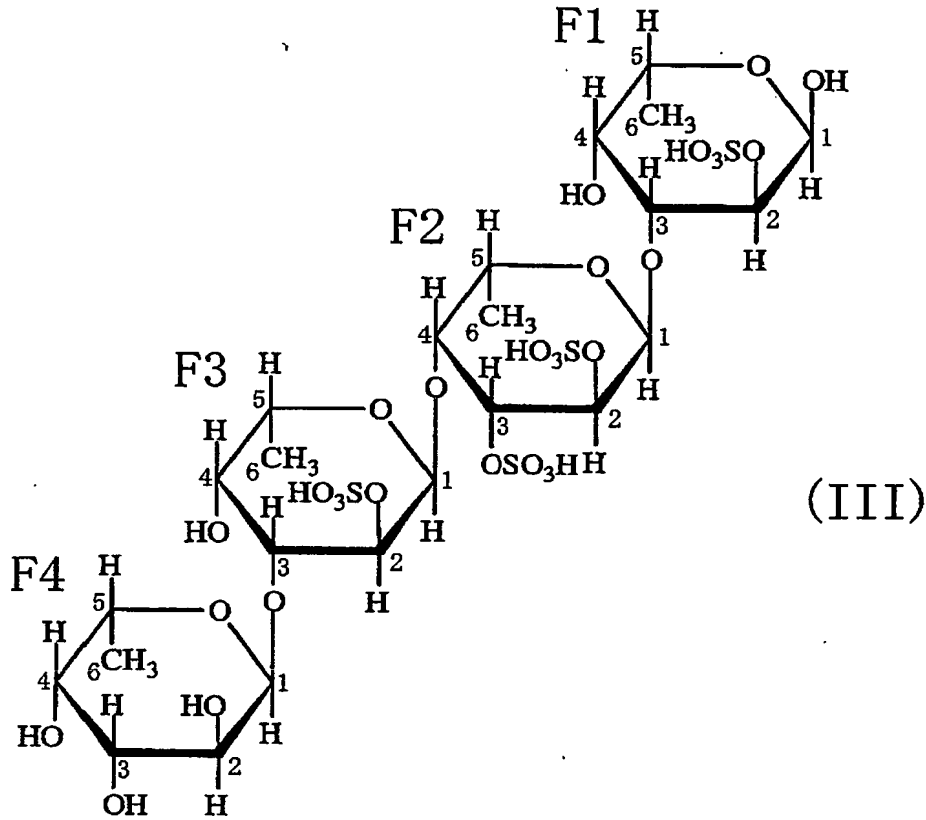
【0073】

糖組成 L-フコース4分子

硫酸基 4分子

なお、¹H-NMR及び¹³C-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式（
I I I）の通りである。

【化13】



【0074】

(c) 本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(3)の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、¹H-NMRスペクトルを図9に、¹³C-NMRスペクトルを図10に、マススペクトルを図11にそれぞれ示した。図9、10において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値(ppm)を示す。また、図11において、縦軸は相対強度(%)を、横軸は、m/z値を示す。

分子量；1454

MS m/z；379.1, [M+3Na⁺-7H⁺]⁴⁻；513.2, [M+4Na⁺-7H⁺]³⁻；781.1, [M+5Na⁺-7H⁺]²⁻

$^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ による分析結果を表5、6に示す。

【0075】

【表5】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	$^1\text{H-NMR}$ ケミカルシフト値、多重度、結合定数	$^{13}\text{C-NMR}$
F1-1	5.43, d, 3.5	91.4
F1-2	4.47, m	74.25 or 74.3 or 74.4
F1-3	4.01, dd, 3.5, 10.0	74.25 or 74.3 or 74.4
F1-4	4.04, m	69.9
F1-5	4.17, m	66.8
F1-6	1.18, d, 6.5	16.3
F2-1	5.33, m	95.67 or 95.71
F2-2	4.58, dd, 3.5, 11.0	73.3 or 73.4
F2-3	4.70, dd, 2.5, 11.0	74.8 or 74.9
F2-4	4.22, m	80.5
F2-5	4.49, m	68.7
F2-6	1.34, d, 6.5	16.5
F3-1	5.24, d, 3.5	99.7
F3-2	4.52, m	74.25 or 74.3 or 74.4
F3-3	4.16, dd, 3.5, 10.0	74.25 or 74.3 or 74.4
F3-4	4.06, d, 3.0	70.3
F3-5	4.35, m	67.9
F3-6	1.24, d, 6.5	16.19

【0076】

【表 6】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F4-1	5.33, m	95.67 or 95.71
F4-2	4.59, dd, 3.5, 11.0	73.3 or 73.4
F4-3	4.73, dd, 2.5, 11.0	74.8 or 74.9
F4-4	4.22, m	80.3
F4-5	4.56, m	68.7
F4-6	1.33, d, 6.5	16.5
F5-1	5.24, d, 3.5	99.5
F5-2	4.49, m	74.25 or 74.3 or 74.4
F5-3	4.16, dd, 3.5, 10.0	72.3
F5-4	4.04, m	69.9
F5-5	4.38, m	68.0
F5-6	1.23, d, 6.5	16.19
F6-1	5.01, d, 4.0	96.2
F6-2	3.72, dd, 4.0, 10.5	69.0
F6-3	3.91, dd, 3.5, 10.5	70.3
F6-4	3.77, d, 3.5	72.9
F6-5	4.41, m	67.8
F6-6	1.16, d, 6.5	16.16

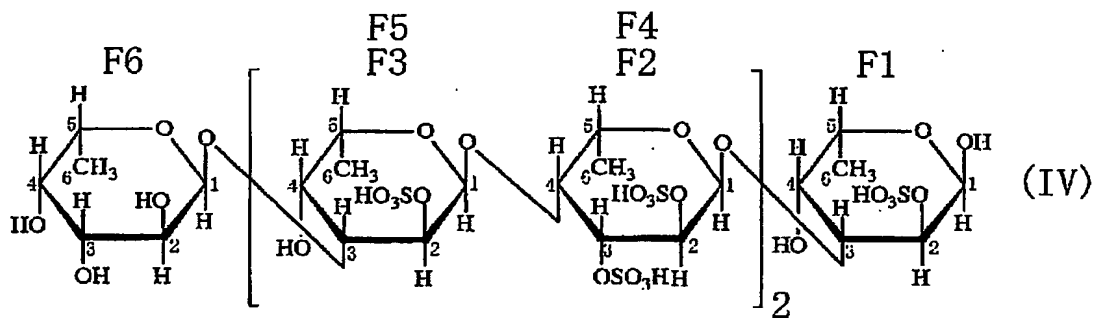
【0077】

糖組成 L-フコース 6分子

硫酸基 7分子

なお、¹H-NMR及び¹³C-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式 (I V) の通りである。

【化14】



【0078】

(d) 本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトルを図12に、 ^{13}C -NMRスペクトルを図13に、マススペクトルを図14にそれぞれ示した。図12、13において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図14において、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量；1986

MS m/z ；418.3, $[\text{M}+5\text{Na}^+-10\text{H}^+]^{5-}$ ；528.5, $[\text{M}+6\text{Na}^+-10\text{H}^+]^{4-}$ ；712.4, $[\text{M}+7\text{Na}^+-10\text{H}^+]^{3-}$ ；1080.6, $[\text{M}+8\text{Na}^+-10\text{H}^+]^{2-}$

^1H -NMR及び ^{13}C -NMRによる分析結果を表7~9に示す。

【0079】

【表7】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F1-1	5.43, d, 3.5	91.4
F1-2	4.47, dd, 4.0, 10.0	74.2 or 74.3 or 74.4
F1-3	4.01, dd, 3.5, 10.5	74.2 or 74.3 or 74.4
F1-4	4.04, d, 3.5	69.8 or 69.9
F1-5	4.18, m	66.8
F1-6	1.17, d, 7.0	16.3
F2-1	5.33, m	95.5 or 95.6 or 95.7
F2-2	4.58, dd, 3.5, 10.5	73.3 or 73.4
F2-3	4.70, dd, 2.5, 11.0	74.8 or 74.9
F2-4	4.23, m	80.6
F2-5	4.49, m	68.7
F2-6	1.33, m	16.5
F3-1	5.24, m	99.5 or 99.6 or 99.7
F3-2	4.52, m	74.2 or 74.3 or 74.4
F3-3	4.16, dd, 3.0, 10.5	74.2 or 74.3 or 74.4
F3-4	4.06, m	70.2 or 70.27 or 70.32
F3-5	4.33, m	67.8
F3-6	1.23, m	16.2

【0080】

【表 8】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F4-1	5.33, m	95.5 or 95.6 or 95.7
F4-2	4.58, dd, 3.5, 10.5	73.3 or 73.4
F4-3	4.73, dd, 2.5, 11.0	74.8 or 74.9
F4-4	4.23, m	80.2 or 80.3
F4-5	4.56, m	68.7
F4-6	1.33, m	16.5
F5-1	5.24, m	99.5 or 99.6 or 99.7
F5-2	4.52, m	74.2 or 74.3 or 74.4
F5-3	4.16, dd, 3.0, 10.5	74.2 or 74.3 or 74.4
F5-4	4.06, m	70.2 or 70.27 or 70.32
F5-5	4.38, m	67.8
F5-6	1.23, m	16.2
F6-1	5.33, m	95.5 or 95.6 or 95.7
F6-2	4.58, dd, 3.5, 10.5	73.3 or 73.4
F6-3	4.73, dd, 2.5, 11.0	74.8 or 74.9
F6-4	4.23, m	80.2 or 80.3
F6-5	4.56, m	68.7
F6-6	1.33, m	16.5

【0081】

【表 9】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	$^1\text{H-NMR}$ ケミカルシフト値、多重度、結合定数	$^{13}\text{C-NMR}$
F7-1	5.24, m	99.5 or 99.6 or 99.7
F7-2	4.49, m	74.2 or 74.3 or 74.4
F7-3	4.16, dd, 3.0, 10.5	72.3
F7-4	4.04, d, 3.5	69.8 or 69.9
F7-5	4.38, m	68.0
F7-6	1.23, m	16.2
F8-1	5.01, d, 3.5	96.2
F8-2	3.72, dd, 4.0, 10.0	69.0
F8-3	3.91, dd, 3.5, 10.5	70.2 or 70.27 or 70.32
F8-4	3.77, d, 4.0	72.9
F8-5	4.40, m	67.8
F8-6	1.16, d, 7.0	16.2

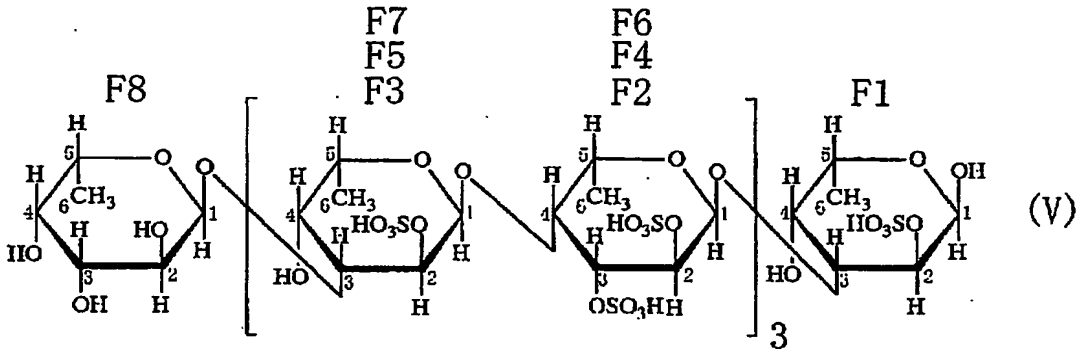
【0082】

糖組成 L-フコース 8分子

硫酸基 10分子

なお、 $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ におけるピークの帰属の番号は下記式 (V) の通りである。

【化 15】



【0083】

(e) 本発明の硫酸化フカンオリゴ糖 1 - (5) の物性

質量分析及びNMR分析の帰属の結果を以下に示し、 ^1H -NMRスペクトルを図15に、 ^{13}C -NMRスペクトルを図16に、マススペクトルを図17にそれぞれ示した。図15、16において縦軸はシグナルの強度を、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。また、図17において、縦軸は相対強度 (%) を、横軸は、 m/z 値を示す。

分子量 ; 2518

MS m/z ; 327.6, $[\text{M} + 5\text{Na}^+ - 13\text{H}^+]^{8-}$; 377.8, $[\text{M} + 6\text{Na}^+ - 13\text{H}^+]^{7-}$; 444.5, $[\text{M} + 7\text{Na}^+ - 13\text{H}^+]^{6-}$; 538.0, $[\text{M} + 8\text{Na}^+ - 13\text{H}^+]^{5-}$; 678.1, $[\text{M} + 9\text{Na}^+ - 13\text{H}^+]^{4-}$; 912.4, $[\text{M} + 10\text{Na}^+ - 13\text{H}^+]^{3-}$

^1H -NMR及び ^{13}C -NMRによる分析結果を表10~13に示す。

【0084】

【表10】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F1-1	5.43, d, 4.0	91.4
F1-2	4.47, dd, 4.0, 10.0	74.1 or 74.3 or 74.4
F1-3	4.01, dd, 3.5, 10.5	74.1 or 74.3 or 74.4
F1-4	4.04, d, 2.5	69.8 or 69.9
F1-5	4.17, m	66.8
F1-6	1.17, d, 6.5	16.3
F2-1	5.35, m	95.3 or 95.6 or 95.7
F2-2	4.60, m	73.3 or 73.4
F2-3	4.70, dd, 2.5, 11.0	74.8 or 75.0
F2-4	4.22, m	80.6
F2-5	4.50, m	68.6 or 68.7 or 68.75 or 68.81
F2-6	1.33, m	16.45 or 16.54
F3-1	5.23, m	99.3 or 99.5 or 99.7
F3-2	4.52, m	74.1 or 74.3 or 74.4
F3-3	4.16, dd, 3.0, 10.5	74.1 or 74.3 or 74.4
F3-4	4.06, m	70.3
F3-5	4.32, q, 7.0	67.8
F3-6	1.23, m	16.2

【0085】

【表 11】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F4-1	5.35, m	95.3 or 95.6 or 95.7
F4-2	4.60, m	73.3 or 73.4
F4-3	4.75, m	74.8 or 75.0
F4-4	4.22, m	79.8 or 80.1 or 80.2
F4-5	4.55, m	68.6 or 68.7 or 68.75 or 68.81
F4-6	1.33, m	16.45 or 16.54
F5-1	5.23, m	99.3 or 99.5 or 99.7
F5-2	4.52, m	74.1 or 74.3 or 74.4
F5-3	4.16, dd, 3.0, 10.5	74.1 or 74.3 or 74.4
F5-4	4.06, m	70.3
F5-5	4.39, m	67.8
F5-6	1.23, m	16.2
F6-1	5.35, m	95.3 or 95.6 or 95.7
F6-2	4.60, m	73.3 or 73.4
F6-3	4.75, m	74.8 or 75.0
F6-4	4.22, m	79.8 or 80.1 or 80.2
F6-5	4.55, m	68.6 or 68.7 or 68.75 or 68.81
F6-6	1.33, m	16.45 or 16.54

【0086】

【表 12】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F7-1	5.23, m	99.3 or 99.5 or 99.7
F7-2	4.52, m	74.1 or 74.3 or 74.4
F7-3	4.16, dd, 3.0, 10.5	74.1 or 74.3 or 74.4
F7-4	4.06, m	70.3
F7-5	4.39, m	67.8
F7-6	1.23, m	16.2
F8-1	5.35, m	95.3 or 95.6 or 95.7
F8-2	4.60, m	73.3 or 73.4
F8-3	4.75, m	74.8 or 75.0
F8-4	4.22, m	79.8 or 80.1 or 80.2
F8-5		68.6 or 68.7 or 68.75 or 68.81
F8-6	1.33, m	16.45 or 16.54
F9-1	5.23, m	99.3 or 99.6 or 99.7
F9-2	4.49, m	74.1 or 74.3 or 74.4
F9-3	4.16, dd, 3.0, 10.5	72.2
F9-4	4.04, d, 2.5	69.8 or 69.9
F9-5	4.39, m	68.0
F9-6	1.23, m	16.2

【0087】

【表 13】

	ケミカルシフト値 (ppm)	
	¹ H-NMR ケミカルシフト値、多重度、結合定数	¹³ C-NMR
F10-1	5.01, d, 4.0	96.1
F10-2	3.72, dd, 4.0, 10.0	69.0
F10-3	3.91, dd, 3.5, 10.5	70.3
F10-4	3.77, d, 3.0	72.9
F10-5	4.40, m	67.8
F10-6	1.16, d, 7.0	16.2

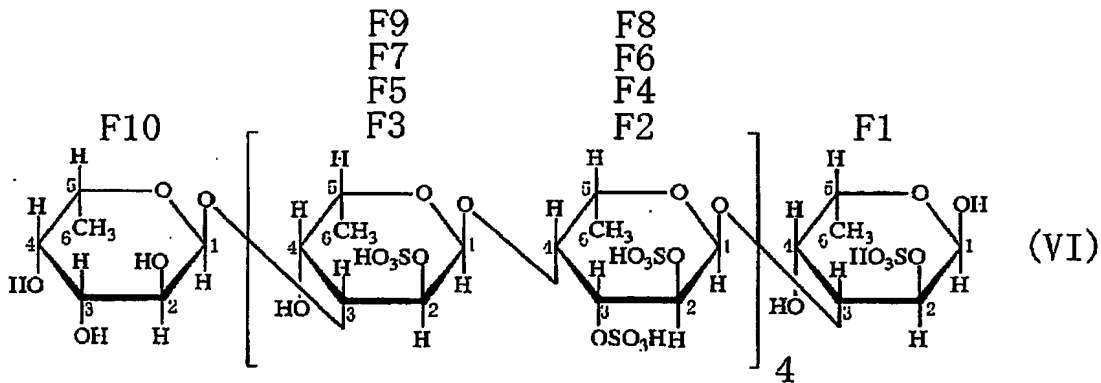
【0088】

糖組成 L-フコース 10分子

硫酸基 13分子

なお、¹H-NMR及び¹³C-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式 (VI) の通りである。

【化 16】



【0089】

(5) 本発明の硫酸化フカン分解酵素に含まれる酵素種

実施例 2 に示すオリゴ糖 1 - (1) ~ (5) は総て一般式 (I) で表すことができる。すなわち同じ骨格を持つ多糖から生成してきたと考えられる。これらの

オリゴ糖の還元性末端糖が総てL-フコースであることから、硫酸化フカン分解酵素にはエンド型 α -L-フコシダーゼが存在していることがわかった。また、これらのオリゴ糖は2糖繰り返し構造を持っていることから、上記のエンド型 α -L-フコシダーゼは α (1-4) L-フコシル結合を切断する酵素であることがわかった。また、上記のオリゴ糖を得たときの反応液には硫酸、L-フコース、酢酸が検出されたことから、実施例1で得られた硫酸化フカン分解酵素標品中には、スルファターゼ活性、フコシダーゼ活性、デアセチラーゼ活性が混在することが示唆された。

【0090】

(6) エンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ活性測定

実施例2記載の硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)を用いて、エンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの活性測定系を確立した。まず、実施例2-(4)記載の方法で本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)の還元性末端を2-アミノピリジンで蛍光標識した。エンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの活性は以下の様にして測定した。

【0091】

すなわち、75 μ lの100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)、7.5 μ lの2mg/mlの牛血清アルブミン溶液、3.75 μ lの4M塩化ナトリウム、50.25 μ lの水、6 μ lの10pmol/ μ lの本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)の還元性末端を2-アミノピリジンで蛍光標識したもの、及び7.5 μ lの本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ溶液を混合し、30 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた後、反応液を100 $^{\circ}$ Cで10分間処理し、HPLCで分析した。対照として、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの代わりに、その酵素の溶媒を用いて反応させたもの及び基質の代わりに水を用いて反応させたものを同様に分析した。HPLCは下記の様に行った。

カラム TSK-gel Octyl-80Ts (4.6 x 250 mm, 東ソー製)

カラム温度 40 $^{\circ}$ C

【0092】

溶離液

各溶離液の200 mM酢酸トリエチルアミン緩衝液 pH 5.5 とアセトニトリルの比率を以下に記載する。

A液 95 : 5

B液 70 : 30

C液 40 : 60

HPLCによる分析時の溶離液の組成を以下に記載する。

0～7分 A液

7～25分 A液からAとB液の混合液 (A : B = 10 : 90) へのグラジエント。

25～26分 AとB液の混合液 (A : B = 10 : 90) からCへのグラジエント。

26～34分 C液

【0093】

流速 1 ml / 分

検出 蛍光 (励起波長 320 nm、蛍光波長 400 nm)

【0094】

1単位のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ活性は上記反応系において1分間に1 μ mole のフコシル結合を切断する酵素量とした。切断したフコシル結合の量は下記式により求めた。

【0095】

$$S / (180 \times 0.0075 \times 10^6) = U / \text{ml}$$

S : 分解された基質のモル数 (p mole)

180 : 反応時間 (分)

0.0075 : 酵素液量 (ml)

【0096】

また、タンパク質の定量は酵素液の280 nmの吸光度を測定することにより行い、その際1 mg / mlのタンパク質溶液の吸光度を1.0として計算した。

【0097】

実施例3 エンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ

(1) エンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの部分精製

実施例1の方法でフコフィラス フコイダノリイティカス SI-1234を培養し、培養液60リットルから、遠心分離により菌体を回収した。

得られた菌体を2360mlの10mM塩化カルシウムと400mMの塩化ナトリウムと5mMのアジ化ナトリウムを含む10mMのイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して上清を得た。この上清を50mMの塩化ナトリウムと5mMのアジ化ナトリウムを含む10mMのイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.0)で充分透析し、生じた沈殿を遠心分離により除去して上清、すなわち本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの粗酵素溶液を得た。

【0098】

上記のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ粗酵素溶液を上記と同じ緩衝液で平衡化させた、3000mlのDEAE-セルロファインA-800にかけた。すなわち、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの粗酵素溶液を添加後、上記緩衝液で充分洗浄し、50mMから600mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は1本あたり60mlとした。

【0099】

各フラクションの本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ活性を測定し、活性画分を200mMの塩化ナトリウムと20mMのリン酸2水素カリウムを含む10mMのイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.0)で平衡化させた150mlのヒドロキシルアパタイトカラムにかけた。すなわち、酵素溶液を添加後、平衡化用緩衝液で充分洗浄し、20mMから400mMのリン酸2水素カリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は1本あたり10mlとした。

【0100】

各フラクションのエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ活性を測定し、活性画分を排除分子量1万の限外ろ過膜を装着させた限外ろ過機で濃縮し、100mMの塩化ナトリウムと5mMのアジ化ナトリウムを含む10mMのイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.5)で平衡化させたセファクリルS-200のカラム(4.4×100cm)にかけた。すなわち、酵素溶液を添加後、上記緩衝液で

溶出させた。分取は1本あたり13mlとした。以上の精製工程を表14に示す。

【0101】

【表14】

工程	タンパク質量 (mg)	総活性 (mU)	比活性 (mU/mg)	収率 (%)
抽出液	29,430	3,070	0.104	100
透析	21,900	3,330	0.152	108
DEAE-セルロファイブ	478	685	1.43	22.3
ヒドロキシルアパタイト	20.7	219	10.6	7.13
セファクリルS-200	2.66	32.7	12.3	1.07

【0102】

本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼがエンド的に α 1-4 L-フコシル結合を切断することを確認するため下記の実験を行った。

すなわち、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼを、還元性末端を2-アミノピリジンで蛍光標識した本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)に作用させた反応液を少量とり、乾固後、その中に存在するオリゴ糖を2-アミノピリジンで蛍光標識し、HPLCにより分析した。なお、標準物質として本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(2)を2-アミノピリジンで蛍光標識したものをを用いた。その結果、酵素反応により切断されて生じたオリゴ糖は総て本発明の硫酸化フカンオリゴ糖1-(2)と同じ物質であることがわかった。すなわち、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼが、Fucus vesiculosus由来硫酸化フカンに存在する α -(1-4) L-フコシル結合をエンド的に切断する酵素であることが確認された。本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの至適pHと至適温度をそれぞれ図18、図19に示す。

【0103】

しかしながら、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼを単独でFucus vesiculosus由来硫酸化フカン画分に作用させても低分子

化させることができなかった。上述のように本発明の硫酸化フカン分解酵素を用いて硫酸化フカンオリゴ糖を調製する際には、反応液中にL-フコース、硫酸、酢酸が生じることが分かっている。このことから、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼで硫酸化フカン分解する際には、フコシダーゼ、スルファターゼ、デアセチラーゼ等が共存する必要があると考えられた。

そこで、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼと共存して*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン低分子化させる活性を探索した。

【0104】

(2) 硫酸化フカン低分子化酵素A

本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼと共存して*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン低分子化させる酵素を調製するため、まず該酵素の活性測定系を以下の様に設定した。

すなわち、12 μ lの500 mMイミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、4.8 μ lの2.5%の*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン画分、6 μ lの1 Mの塩化カルシウム、9 μ lの4 M塩化ナトリウム、40.2 μ lの水、24 μ lの0.35-0.4 mU/mlの本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ、及び24 μ lの本発明の硫酸化フカン低分子化酵素A溶液を混合し、30°Cで3時間反応させた後、反応液を100°Cで10分間処理し、HPLCで分析した。対照として、本発明の硫酸化フカン低分子化酵素A溶液の代わりに、その酵素の溶媒を用いて反応させたものを同様に分析した。HPLCは下記の様に行った。

カラム SB-806HQ (4.6 x 250 mm, 昭和電工製)

カラム温度 25°C

溶離液 5 mMのアジ化ナトリウムを含む50 mMの塩化ナトリウム

流速 1 ml/分

検出 示差屈折率検出器

【0105】

1単位の本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aの酵素活性は上記反応系におい

て1分間に1 μmol の割合で、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼによるフコシル結合の切断を増加させる酵素量とした。切断したフコシル結合の量は下記式により求めた。

【0106】

$$(120 / \text{SMr}) \times (\text{SMr} / \text{PMr} - 1) \times 1 / 180 \times 0.024 = U / \text{ml}$$

120 : 基質に使用した硫酸化フカン量 (μg)

SMr : 基質の平均分子量

PMr : 反応生成物の平均分子量

180 : 反応時間 (分)

0.024 : 酵素液量 (ml)

【0107】

また、タンパク質の定量は酵素液の280nmの吸光度を測定することにより行い、その際1mg/mlのタンパク質溶液の吸光度を1.0として計算した。

【0108】

実施例4 硫酸化フカン低分子化酵素A

(1) 硫酸化フカン低分子化酵素Aの部分精製

実施例1の方法でフコフィラス フコイダノリイティカス SI-1234を培養し、培養液60リットルから、遠心分離により菌体を回収した。

得られた菌体を2780mlの10mM塩化カルシウムと400mMの塩化ナトリウムと5mMのアジ化ナトリウムと5mMの β -メルカプトエタノールを含む10mMのイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して上清を得た。この上清を10mMの塩化カルシウムと10mMの塩化ナトリウムと5mMの β -メルカプトエタノールと5mMのアジ化ナトリウムを含む10mMのイミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.0)で充分透析し、生じた沈殿を遠心分離により除去して上清を得た。

【0109】

得られた上清を上記と同じ緩衝液で平衡化させた、3000mlのDEAE-セルロファインA-800にかけた。すなわち、上記の上清を添加後、上記緩衝

液で充分洗浄し、10 mMから600 mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は1本あたり60 mlとした。

各フラクションの、本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aの酵素活性を測定し、活性画分(60-110 mM塩化ナトリウム溶出画分)を10 mMの塩化カルシウムと80 mMの塩化ナトリウムと5 mMのβ-メルカプトエタノールを含む10 mMのイミダゾール-塩酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化させた200 mlのDEAE-セルロファインA-800カラムにかけた。すなわち、該酵素溶液を添加後、平衡化用緩衝液で充分洗浄し、80 mMから240 mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は1本あたり20 mlとした。

【0110】

各フラクションの硫酸化フカン低分子化酵素Aの酵素活性を測定し、活性画分を、200 mMの塩化ナトリウムと10 mMの塩化カルシウムと5 mMのβ-メルカプトエタノールを含む10 mMのイミダゾール-塩酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化させた20 mlの硫酸化セルロファインのカラムにかけた。すなわち、酵素溶液を添加後、上記緩衝液で充分洗浄し、200から700 mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は1本あたり2 mlとした。以上の精製工程を表15に示す。

【0111】

【表15】

工程	タンパク質量 (mg)	総活性 (mU)	比活性 (mU/mg)	収率 (%)
抽出液	33,600	731	0.0218	100
透析	30,900	736	0.0238	101
DEAE-セルロファイン	567	97.2	0.171	13.3
DEAE-セルロファイン	102	43.6	4.27	5.96
硫酸化セルロファイン	9.66	8.40	0.870	1.14

【0112】

本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aの作用機作を確認するため下記の実験を行った。

すなわち、本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aを、*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンに作用させた反応液を少量とり、その中に存在する遊離の硫酸の量をHPLCにより分析した。なお、標準物質としては硫酸ナトリウムを用いた。その結果、酵素反応により遊離の硫酸が生じることがわかった。すなわち、本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aが、*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンに作用して硫酸基を切断する酵素であり、硫酸化フカンスルファターゼ活性を有することが確認された。

【0113】

しかしながら、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼと本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aだけを*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン画分に作用させても実施例2に記載したオリゴ糖を得られるほどには低分子化させることができなかった。上述のように本発明の硫酸化フカン分解酵素群を用いて硫酸化フカンオリゴ糖を調製する際には、反応液中にL-フコース、酢酸も生じることが分かっている。このことから、*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンを分解する際には、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼと本発明の硫酸化フカン低分子化酵素A以外に、フコシダーゼやデアセチラーゼ等が共存する必要があると考えられた。

【0114】

そこで、本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ及び本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aと共存して*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンの低分子化を促進させる活性を探索した。なお、探索する対象の酵素を以下、エキソ型L-フコシダーゼという。

【0115】

(2) エキソ型L-フコシダーゼ

本発明のエキソ型L-フコシダーゼを調製するため、まず該酵素の活性測定系を以下の様に設定した。

すなわち、12 μ lの500mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH7.5)、

4. $8 \mu\text{l}$ の 2.5% の *Fucus vesiculosus* 由来硫酸化フカン画分、 $6 \mu\text{l}$ の 1 M の塩化カルシウム、 $9 \mu\text{l}$ の 4 M 塩化ナトリウム、 $16.2 \mu\text{l}$ の水、 $24 \mu\text{l}$ の 0.35-0.4 mU/ml の本発明のエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼ、 $24 \mu\text{l}$ の 0.04-0.05 mU/ml の本発明の硫酸化フカン低分子化酵素 A、及び $24 \mu\text{l}$ の本発明のエキソ型 L-フコシダーゼを混合し、 30°C で 3 時間反応させた後、反応液を 100°C で 10 分間処理し、HPLC で分析した。対照として、本発明のエキソ型 L-フコシダーゼ溶液の代わりに、その酵素の溶媒を用いて反応させたものを同様に分析した。HPLC は下記の様に行った。

カラム SB-806HQ (4.6 x 250 mm, 昭和電工製)

カラム温度 25°C

溶離液 5 mM のアジ化ナトリウムを含む 50 mM の塩化ナトリウム

流速 1 ml / 分

検出 示差屈折率検出器

【0116】

1 単位のエキソ型 L-フコシダーゼ活性は上記反応系において 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の割合でフコシル結合の切断を増加させる酵素量とした。増加したフコシル結合の量は下記式により求めた。

【0117】

$$(120 / \text{SM}_r) \times (\text{SM}_r / \text{PM}_r - 1) \times 1 / 180 \times 0.024 = \text{U} / \text{ml}$$

120 : 基質に使用した硫酸化フカン量 (μg)

SM_r : 基質の平均分子量

PM_r : 反応生成物の平均分子量

180 : 反応時間 (分)

0.024 : 酵素液量 (ml)

【0118】

また、タンパク質の定量は酵素液の 280 nm の吸光度を測定することにより行い、その際 1 mg/ml のタンパク質溶液の吸光度を 1.0 として計算した。

【 0 1 1 9 】

実施例 5 エキソ型 L - フコシダーゼの部分精製

実施例 2 の方法でフコフィラス フコイダノリイティカス S I - 1 2 3 4 を培養し、培養液 6 0 リットルから、遠心分離により菌体を回収した。

得られた菌体を 2 7 8 0 m l の 1 0 m M 塩化カルシウムと 4 0 0 m M の塩化ナトリウムと 5 m M のアジ化ナトリウムと 5 m M の β - メルカプトエタノールを含む 1 0 m M のイミダゾール - 塩酸緩衝液 (p H 7 . 0) に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して上清を得た。この上清を 1 0 m M の塩化カルシウムと 1 0 m M の塩化ナトリウムと 5 m M の β - メルカプトエタノールと 5 m M のアジ化ナトリウムを含む 1 0 m M のイミダゾール - 塩酸緩衝液 (p H 7 . 0) で充分透析し、生じた沈殿を遠心分離により除去して上清を得た。

【 0 1 2 0 】

得られた上清を上記と同じ緩衝液で平衡化させた、3 0 0 0 m l の D E A E - セルロフィン A - 8 0 0 にかけた。すなわち、上記の上清を添加後、上記緩衝液で充分洗浄し、1 0 m M から 6 0 0 m M の塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は 1 本あたり 6 0 m l とした。

【 0 1 2 1 】

各フラクションのエキソ型 L - フコシダーゼ活性を測定し、活性画分 (1 7 0 ~ 2 0 5 m M 塩化ナトリウム溶出画分) を 1 0 m M の塩化カルシウムと 5 0 m M の塩化ナトリウムと 5 m M の β - メルカプトエタノールを含む 1 0 m M のイミダゾール - 塩酸緩衝液 (p H 7 . 0) で充分透析し、同緩衝液で平衡化させた 5 0 m l の硫酸化セルロフィンカラムにかけた。すなわち、該酵素溶液を添加後、平衡化用緩衝液で充分洗浄し、5 0 m M から 1 M の塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は 1 本あたり 5 m l とした。

【 0 1 2 2 】

各フラクションの本発明のエキソ型 L - フコシダーゼ活性を測定し、活性画分を、1 0 0 m M の塩化ナトリウムと 1 0 m M の塩化カルシウムと 5 m M の β - メルカプトエタノールと 5 m M のアジ化ナトリウムを含む 1 0 m M のイミダゾール - 塩酸緩衝液 (p H 7 . 5) で平衡化させた 2 0 m l の硫酸化セルロフィンの

カラムにかけた。すなわち、酵素溶液を添加後、上記緩衝液で充分洗浄し、100から700 mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出させた。分取は1本あたり2.3 mlとした。以上の精製工程を表16に示す。

【0123】

【表16】

工程	タンパク質量 (mg)	総活性 (mU)	比活性 (mU/mg)	収率 (%)
抽出液	33,600	12,400	0.369	100
透析	30,900	11,900	0.385	96.0
DEAE-セルロファイン	231	778	3.37	6.27
硫酸化セルロファイン	42.7	1,180	27.6	9.52
硫酸化セルロファイン	8.32	1,090	131	8.79

【0124】

本発明のエキソ型L-フコシダーゼの作用機作を確認するため下記の実験を行った。

すなわち、本発明のエキソ型L-フコシダーゼを、Fucus vesiculosus由来硫酸化フカンに作用させた反応液を少量とり、その中に存在する遊離のL-フコースの量を遊離型L-フコース定量用キットにより測定した。その結果、酵素反応により遊離のL-フコースが生じることがわかった。すなわち、本発明のエキソ型L-フコシダーゼが、Fucus vesiculosus由来硫酸化フカンに作用してL-フコース残基を切断する酵素であり、エキソ型L-フコシダーゼであることが確認された。

【0125】

本発明のエンド型 α -(1-4)L-フコシダーゼと本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aと本発明のエキソ型L-フコシダーゼをFucus vesiculosus由来硫酸化フカン画分に作用させると、硫酸化フカンを低分子化させ実施例2に記載したオリゴ糖とほぼ同等の分子量のオリゴ糖が生成した。しかしながら、上述のよ

うに本発明の硫酸化フカン分解酵素を用いて硫酸化フカンオリゴ糖を調製する際には、反応液中に酢酸も生じることが分かっている。

【0126】

そこで、*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン α -1,4-L-フコシダーゼを1Nの水酸化ナトリウムで処理することによりO-アセチル基を加水分解したもの及び未処理の*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンを基質に用いて、本発明のエンド型 α -1,4-L-フコシダーゼ及び本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aを作用させたところ、明らかにO-アセチル基の除去した、*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンのみ低分子化が進むことがわかり、硫酸化フカンの脱アセチル化が、*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンの酵素的低分子化に必要な反応であることが確認できた。

【0127】

また、この結果から、本発明のエンド型 α -1,4-L-フコシダーゼと本発明の硫酸化フカン低分子化酵素Aと本発明のエキソ型L-フコシダーゼの中に硫酸化フカンデアセチラーゼの混入が考えられたので、以下の反応系により該酵素活性を測定した。

すなわち、6 μ lの500mMイミダゾール塩酸緩衝液(pH7.5)、7.2 μ lの2.5%の*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカン画分、3 μ lの1Mの塩化カルシウム、4.5 μ lの4M塩化ナトリウム、33.3 μ lの水、及び6 μ lの硫酸化フカンデアセチラーゼ含有酵素溶液を混合し、30℃で3時間反応させた後、反応液を100℃で10分間処理し、市販の酢酸定量用キットを用いて酢酸量を定量した。対照として、硫酸化フカンデアセチラーゼ含有酵素溶液の代わりに、その酵素溶液の溶媒を用いて反応させたものを同様に分析した。この結果、実施例で部分精製した本発明の硫酸化フカン低分子化酵素A及び本発明のエキソ型L-フコシダーゼにはともに硫酸化フカンデアセチラーゼが含まれていることがわかった。

【0128】

このことから、*Fucus vesiculosus*由来硫酸化フカンを分解する際には、本発明のエンド型 α -1,4-L-フコシダーゼ、本発明の硫酸化フカン低分子化酵素A、本発明のエキソ型L-フコシダーゼ及び硫酸化フカンデアセチラーゼが

関与していることがわかった。

【0129】

【発明の効果】

本発明により硫酸化フカンの構造解析や硫酸化フカンオリゴ糖の再現性よい製造に用いることができる新規の硫酸化フカン分解酵素及び該酵素の製造方法が提供される。また、該酵素を使用することにより製造できる、糖鎖工学用試薬として有用な硫酸化フカンオリゴ糖及びそれらの製造方法が提供される。

【0130】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Sulfated fucan

<130> T-1765

<160> 1

<210> 1

<211> 1517

<212> DNA

<213> *Fucophilus fucoidanolyticus* SI-1234

<400> 1

```

agagtttgat cctggctcag agtgaacgct ggcggcgtgg ttaagacatg caagtcgaac   60
gagattcttt gtattgaagc ctcggtggat ttataaagat gaaagtggca aacgggtgcg   120
taacacgtga gcaatctgcc ctaaagatcg gaatagctcg aggaaactcg aattaatgcc   180
ggatgtgata cgccaactca tgttggtagt attaaagctt gtaatggcgc tttaggagga   240

```


gctcgcggcc tatcagcttg ttggtgaggt aaaggctcac caaggcaaag acgggtagct 300
ggtctgagag gatgatcagc cacactggaa ctgagacacg gtccagacac ctacgggtgg 360
cagcagtttc gaatcattca caatgggggc aaccctgatg gtgcaacgcc gcgtgaggga 420
tgaaggcctt cgggtcgtaa acctctgtca ccaggagca acaagcaggt tcatagcctg 480
ccctgagtta acctggagag gaagcagtgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac 540
ggagactgca agcgttactc ggattcactg ggcgtaaagg gtgcgtaggc ggatagatgt 600
gtcaggtgtg aaatctcggg gctcaacctc gaaactgcgc ctgaaactgt ctatctagag 660
tattggaggg gtaagcggaa tttctggtgt agcggtgaaa tgcgtagata tcagaaggaa 720
caccaatggc gaaggcagct tactggacaa atactgacgc tgaggcacga aagcatgggt 780
agcгааaggg attagatacc cctgtagtcc atgccgtaaа cgttgacac taggtcttgg 840
gggtttcgac cttttcagga ccccagctaa cgcgataagt gtgccgcctg aggactacgg 900
ccgcaaggct aaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgcа caagcgggtg agcatgtggt 960
ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc taggcttgac atgtaatgga cgattttcag 1020
agatgaattt ttcccttcgg ggctgttaca caggtgctgc atggccgtcg tcagctcgtg 1080
tcgtgagatg tttggtaag tccagcaacg agcgcаaccс tcgtccttag ttgccagcac 1140
gtaatgggtg ggactctaag gagacaaact ctctttgaga gtgggaaggт ggggatgacg 1200
tcaggtcagt atggccctta cgcctagggc tacacacgtg ctacaatgcc cggтacaata 1260
ggacgcaata ccgcgaggтg gagcaaatcc tcaaaaccgg gccagttcg gattggagtc 1320
tgcaactcga ctccatgaag tcggaatcgc tagtaatgac gtatcagcta tgacgtcgtg 1380
aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgтcacatca tgaaagccgg ttttgcccga 1440
agtacgtgag ctatccctcg ggaggcagcg tcctaaggca gggctggtga ttgggatgaa 1500
gtcgtaacaa ggtagcc 1517

【 0 1 3 1 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明により得られる硫酸化フカン分解酵素の pH と相対活性 (%) の関係を表すグラフである。

【図 2】 本発明により得られる硫酸化フカン分解酵素の温度 (°C) と相対活性 (%) の関係を表すグラフである。

【図 3】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖 1 - (1) の ¹H-

NMRスペクトルを示す図である。

【図4】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(1)の ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

【図5】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(1)の質量分析(マス)スペクトルを示す図である。

【図6】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(2)の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図7】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(2)の ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

【図8】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(2)の質量分析(マス)スペクトルを示す図である。

【図9】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(3)の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図10】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(3)の ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

【図11】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(3)の質量分析(マス)スペクトルを示す図である。

【図12】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図13】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)の ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

【図14】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(4)の質量分析(マス)スペクトルを示す図である。

【図15】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(5)の ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

【図16】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(5)の ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

【図17】 本発明により得られる硫酸化フカンオリゴ糖1-(5)の質量分析(マス)スペクトルを示す図である。

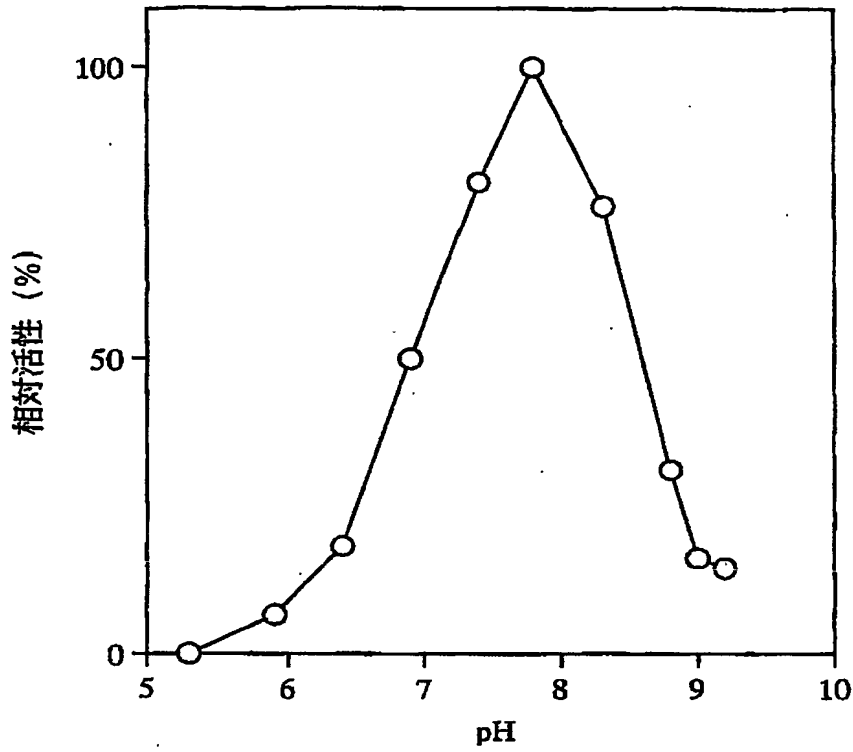
【図18】 本発明により得られるエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼのpHと相対活性(%)の関係を表すグラフである。

【図19】 本発明により得られるエンド型 α -(1-4) L-フコシダーゼの温度(°C)と相対活性(%)の関係を表すグラフである。

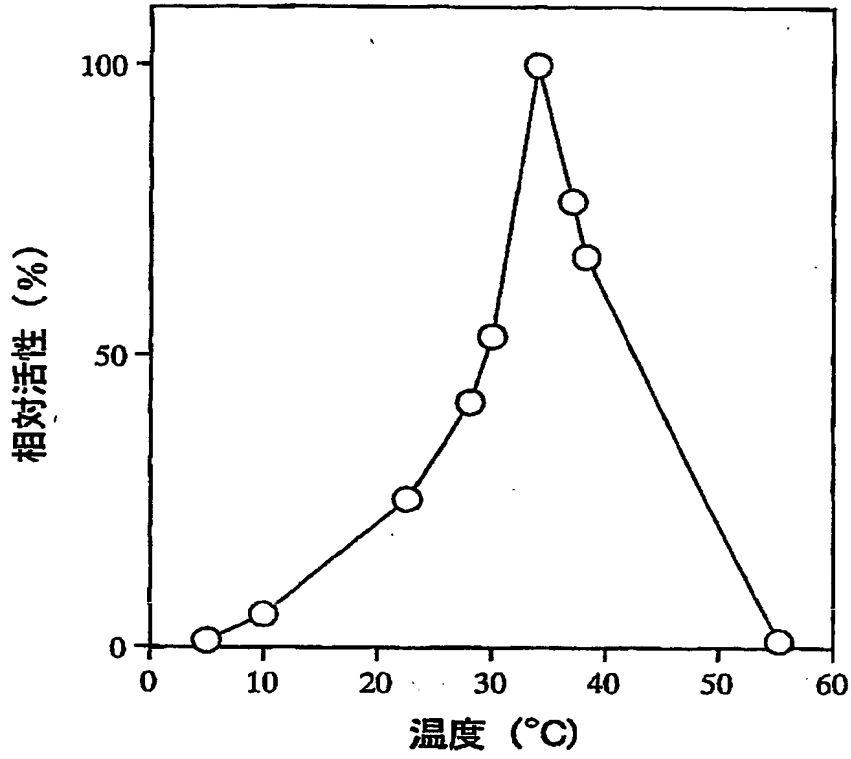
【書類名】

図面

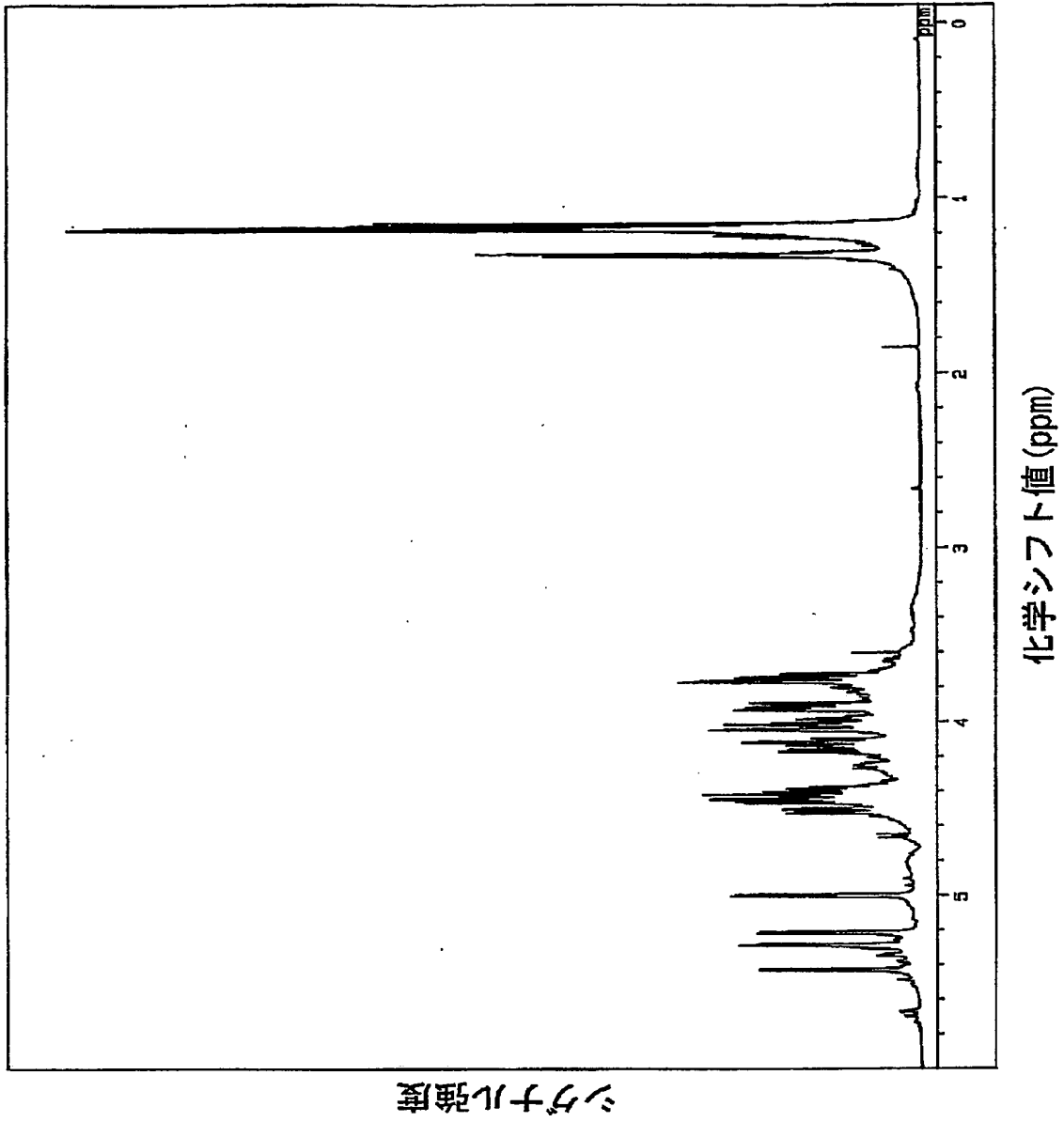
【図1】



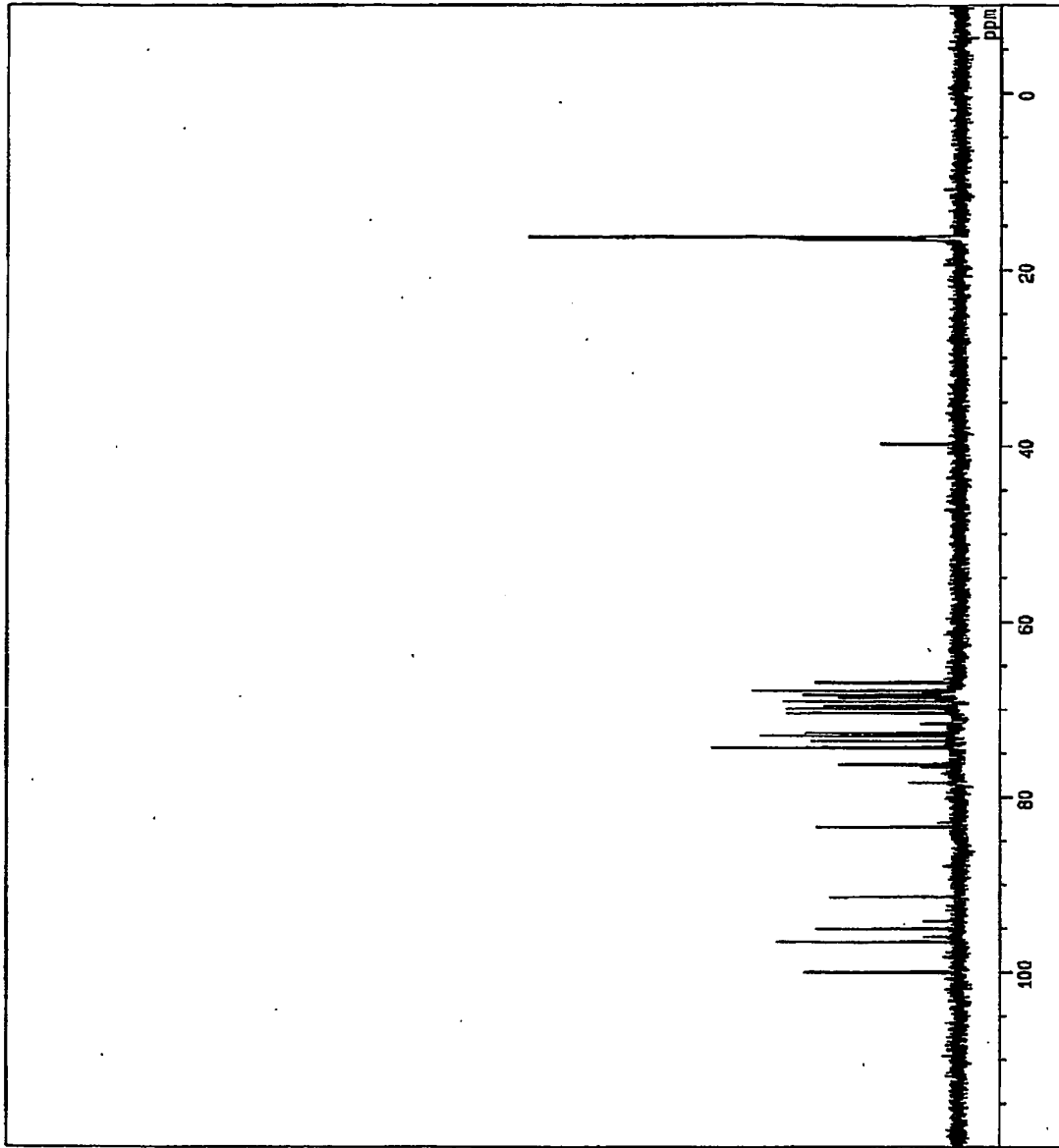
【图2】



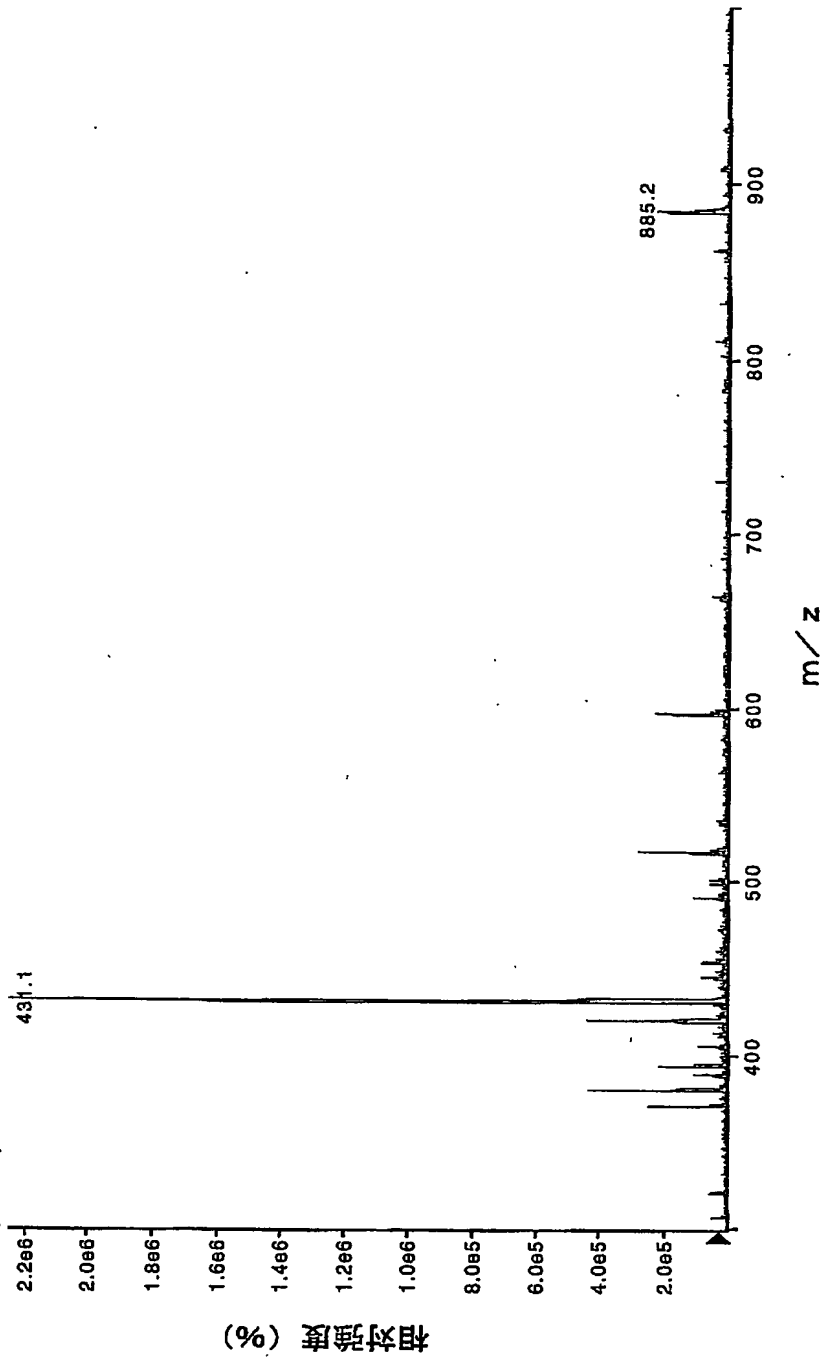
【図3】



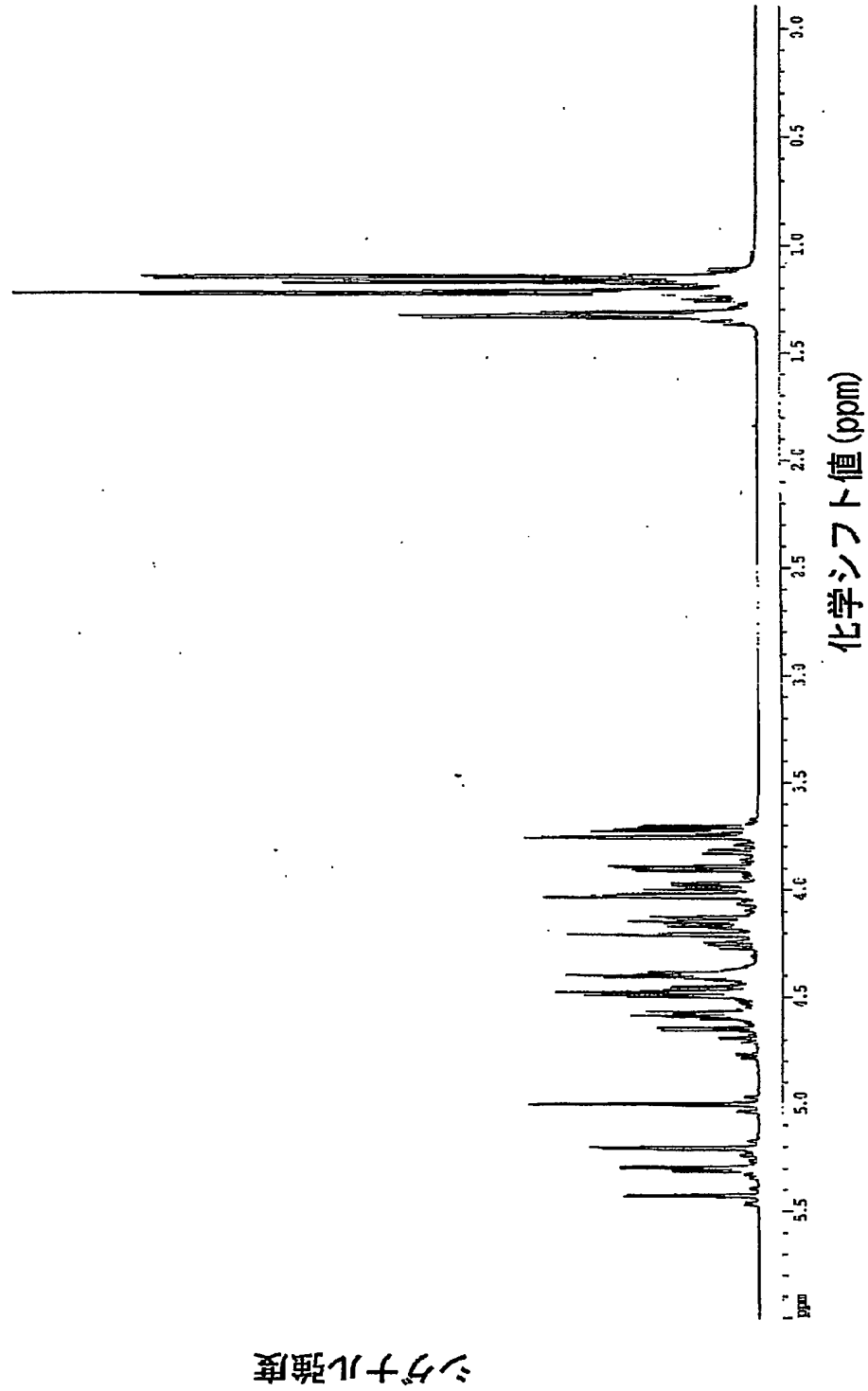
【図4】



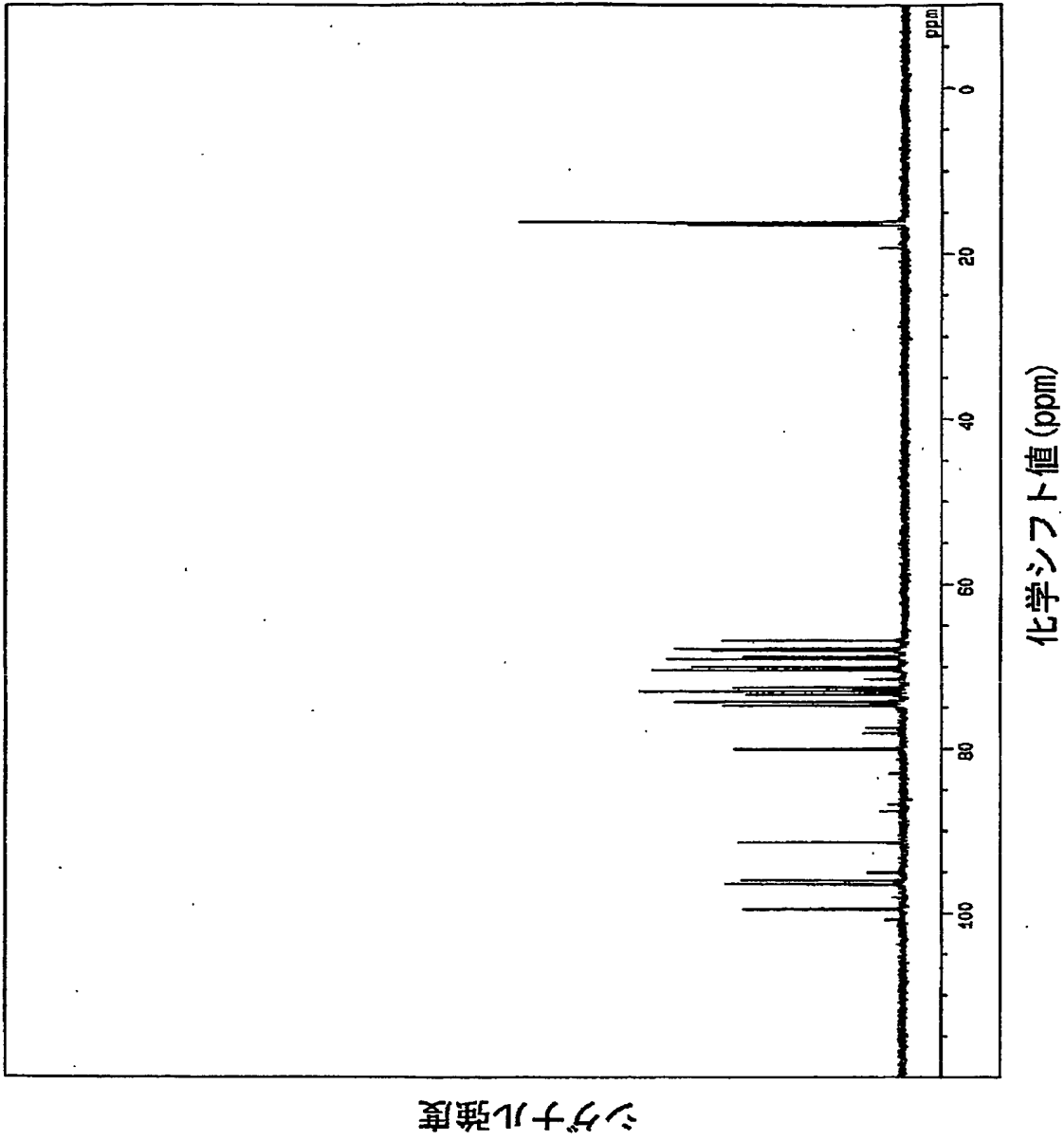
【图 5】



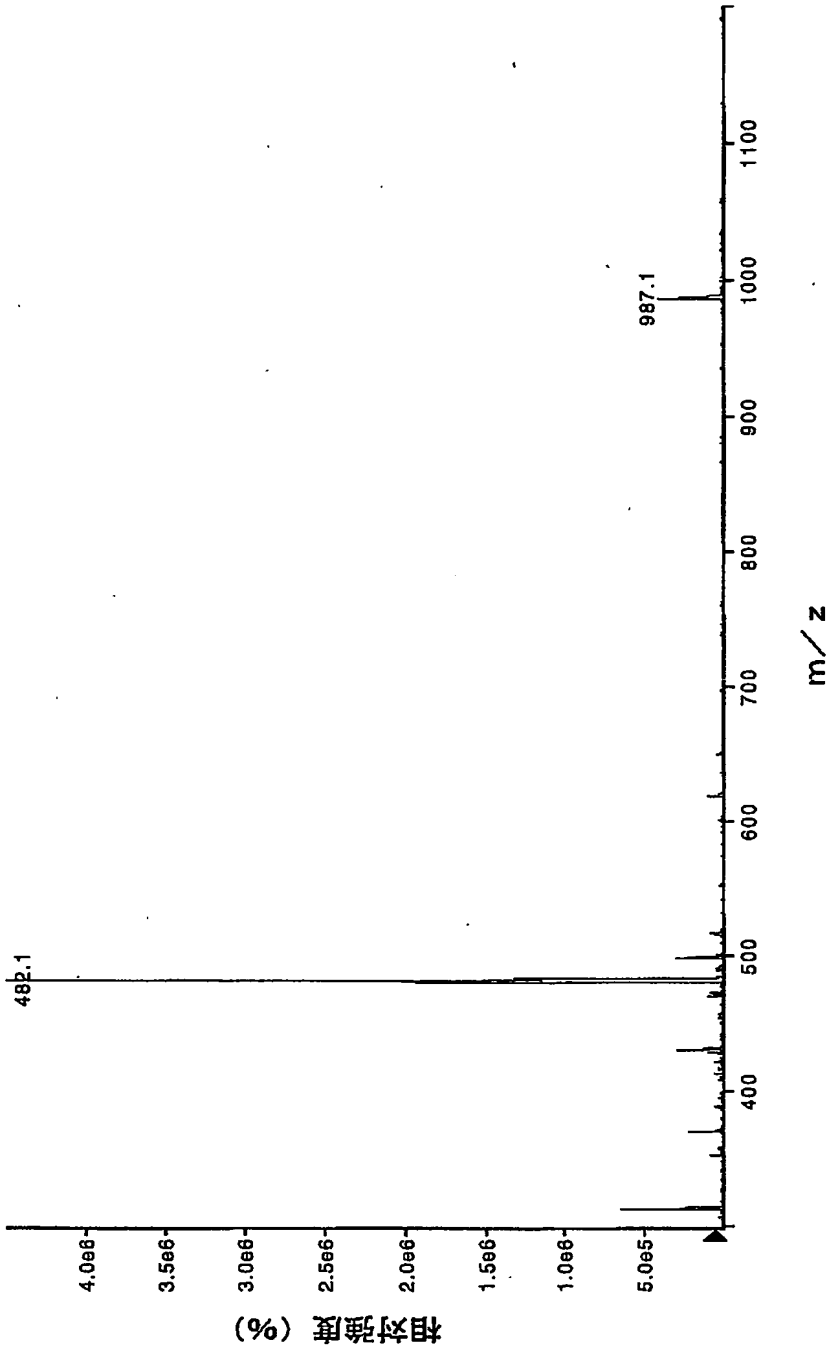
【図6】



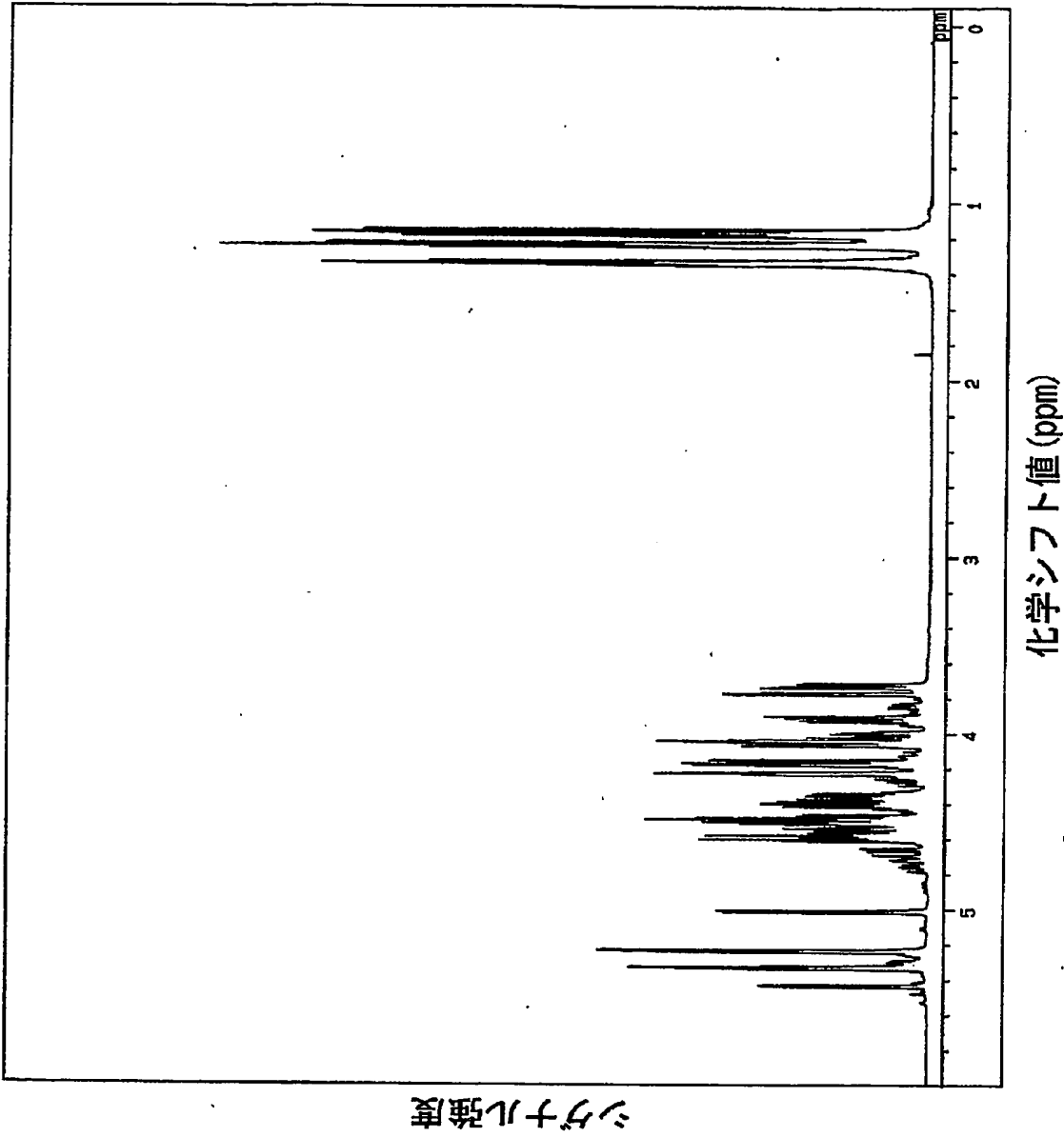
【図7】



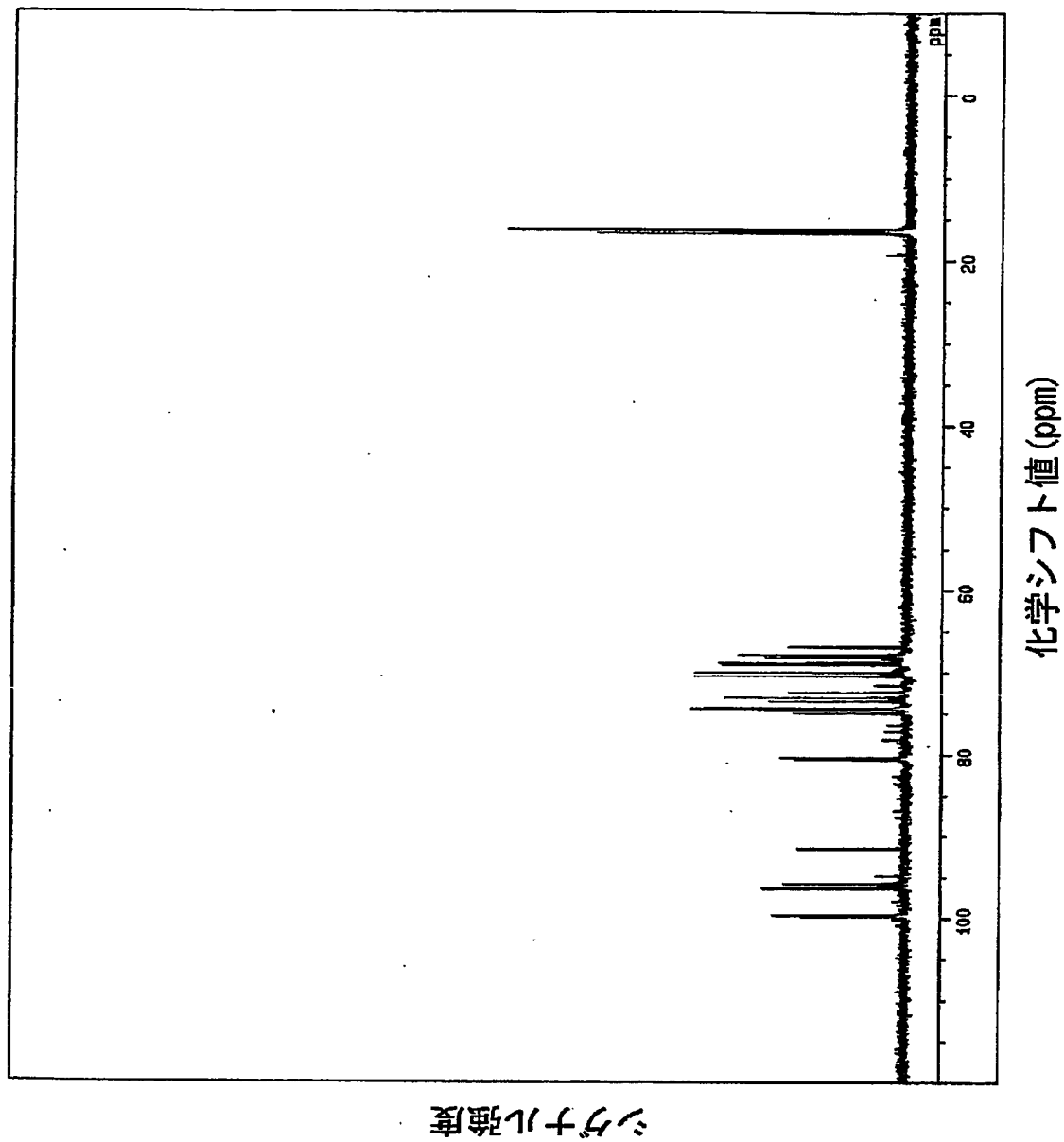
【图 8】



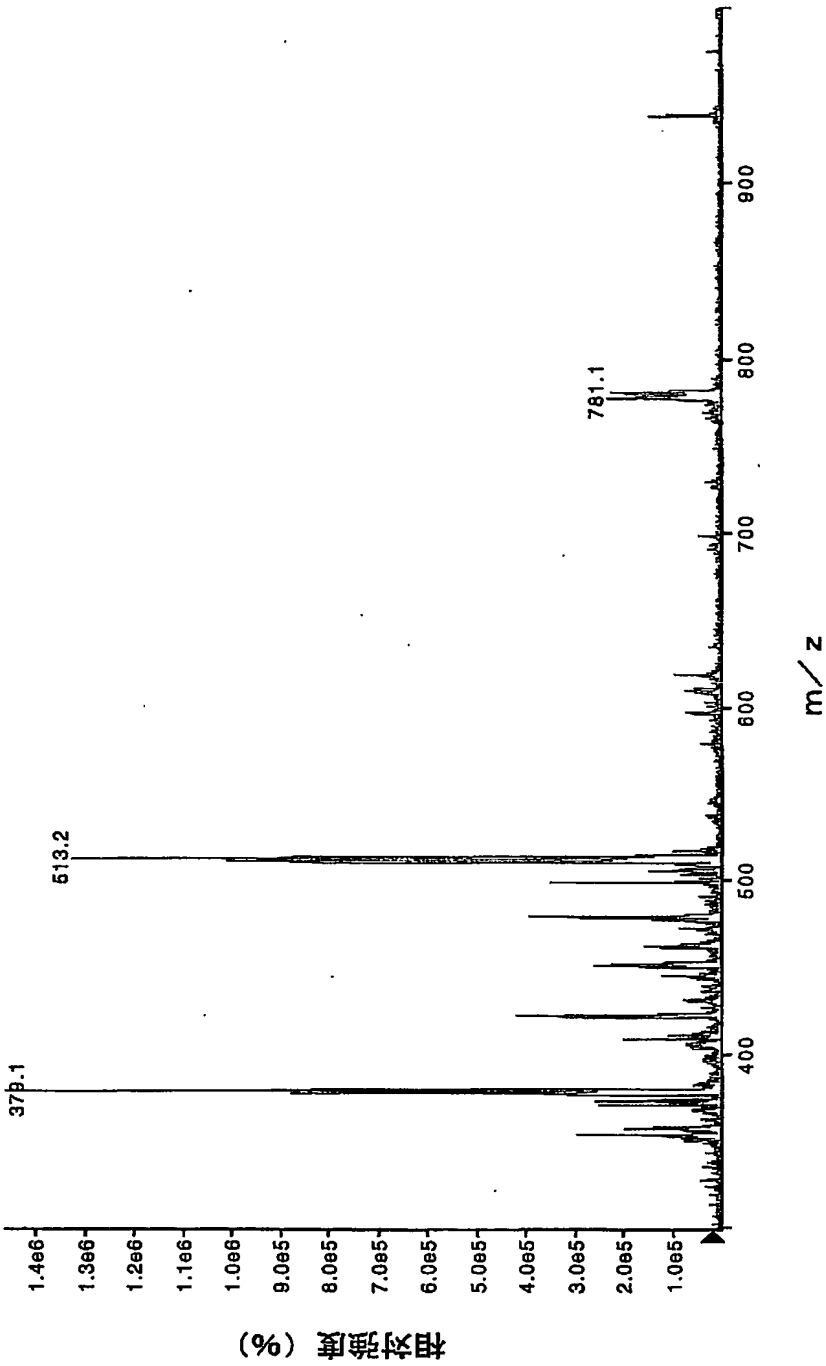
【図9】



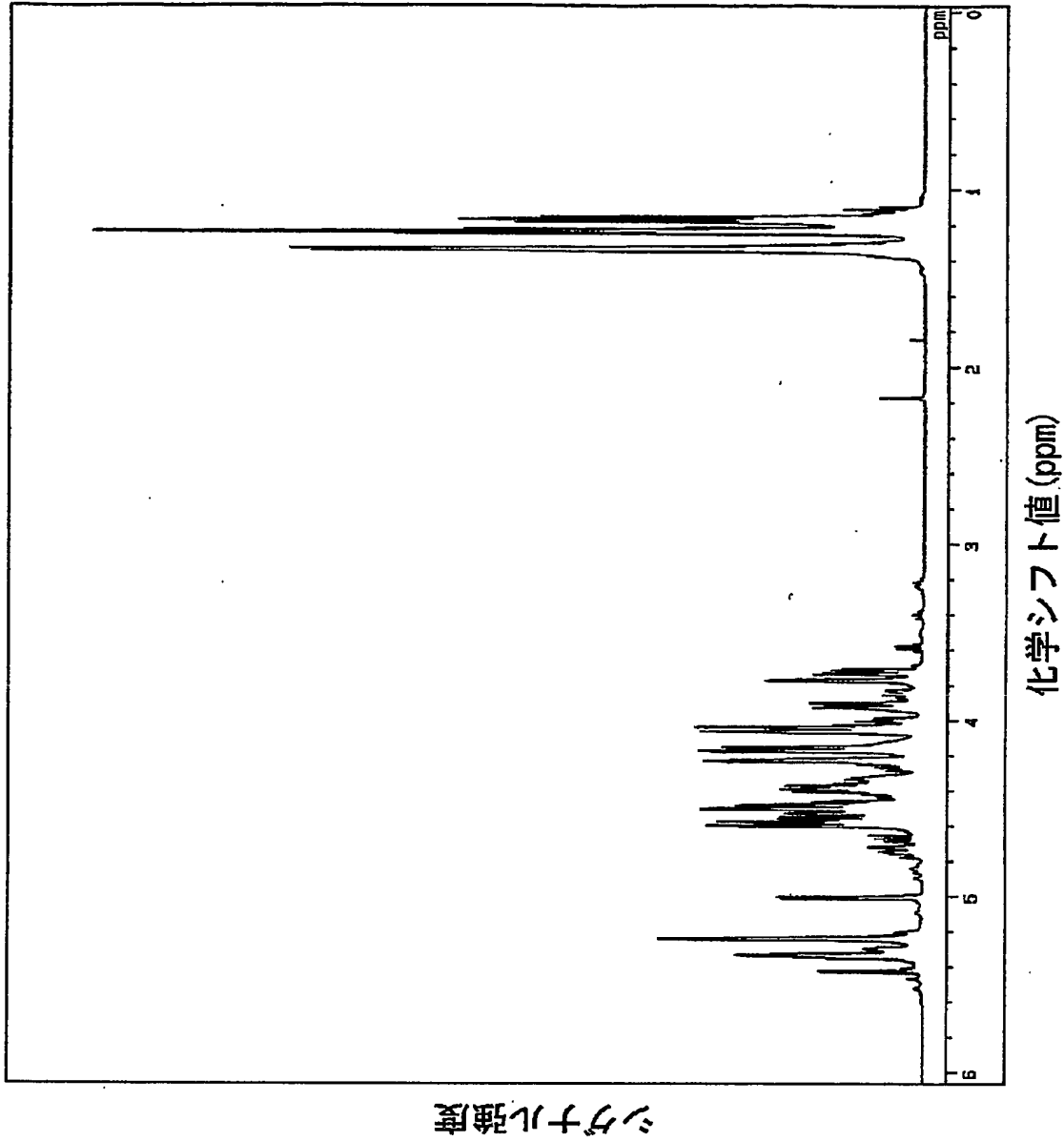
【図10】



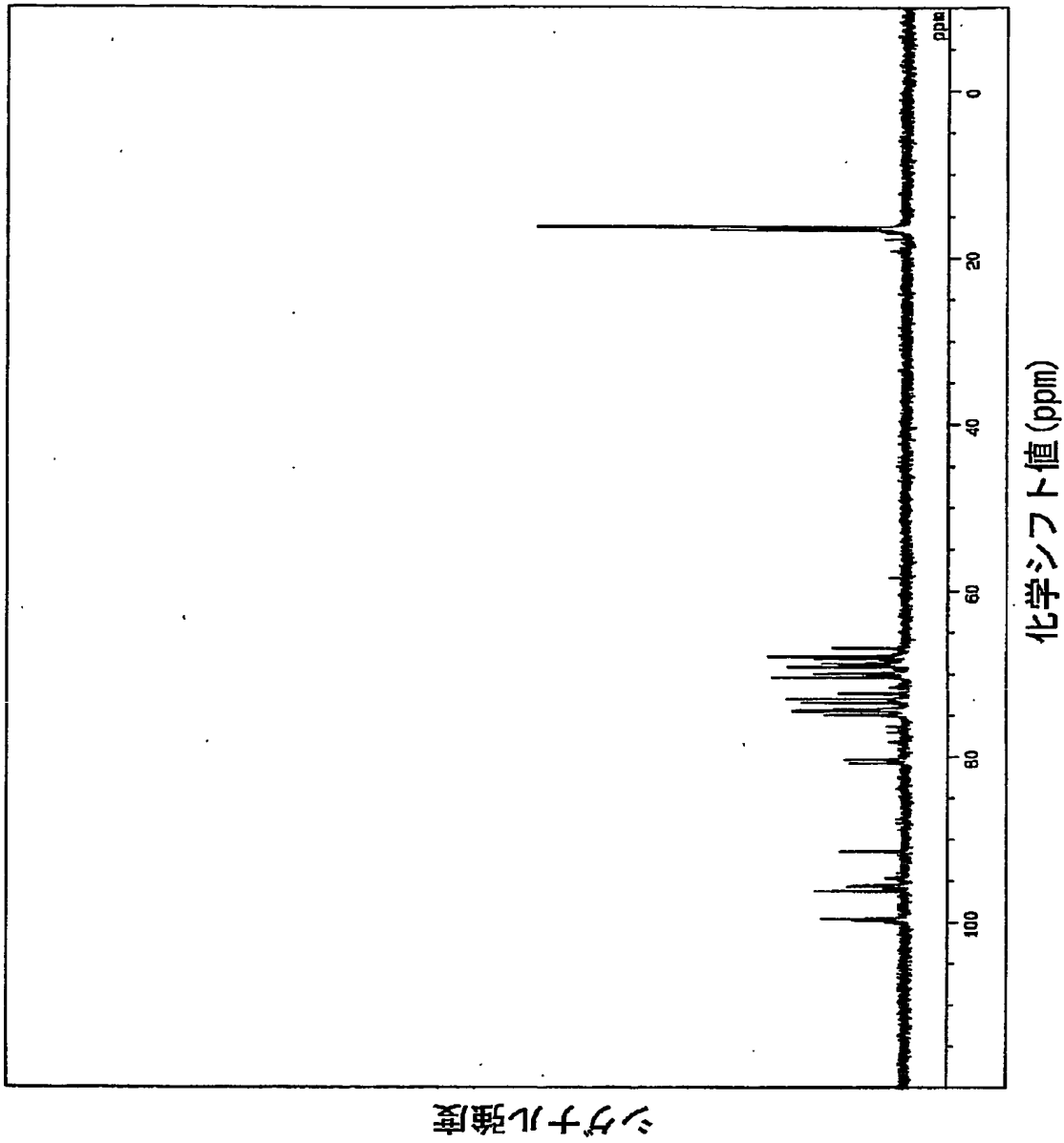
【図11】



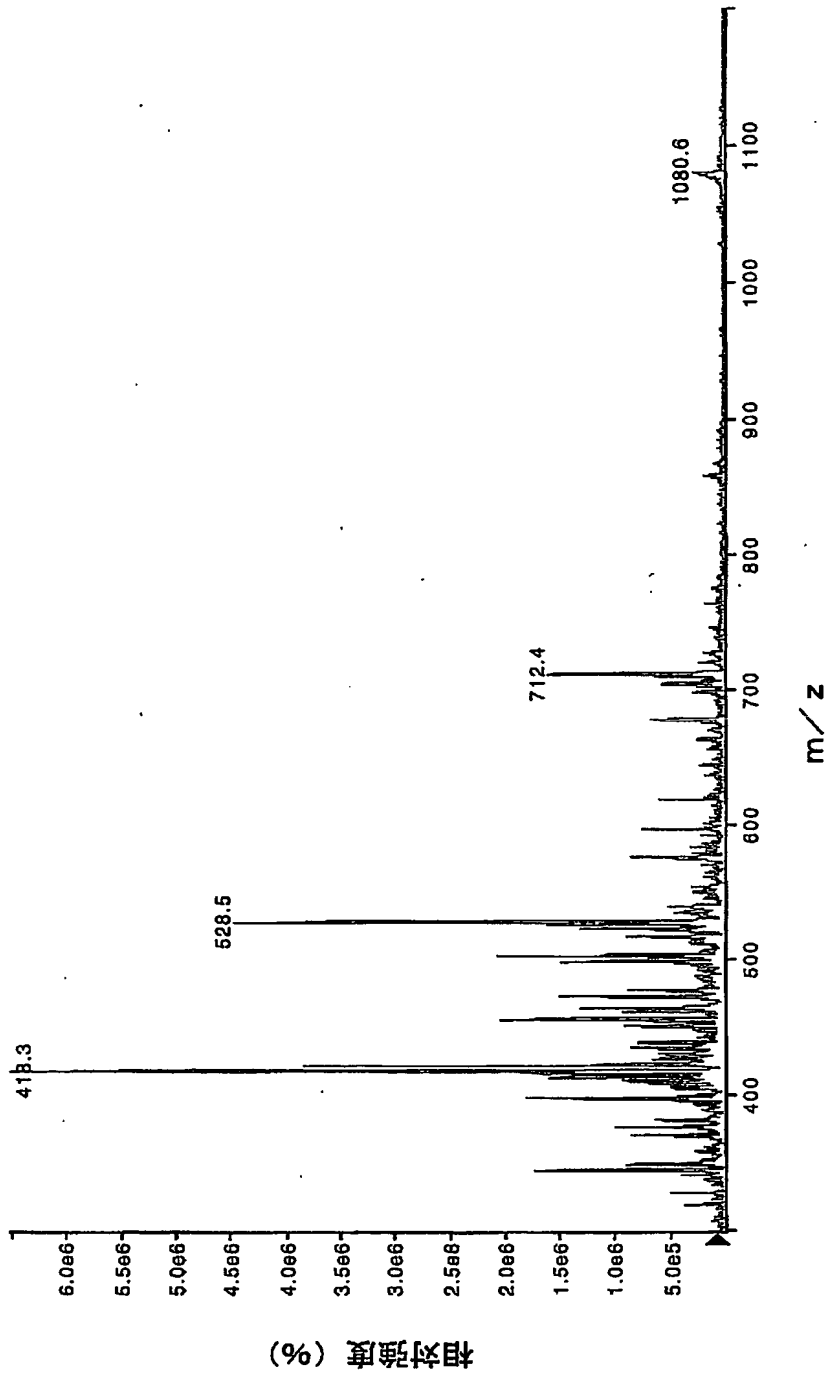
【図12】



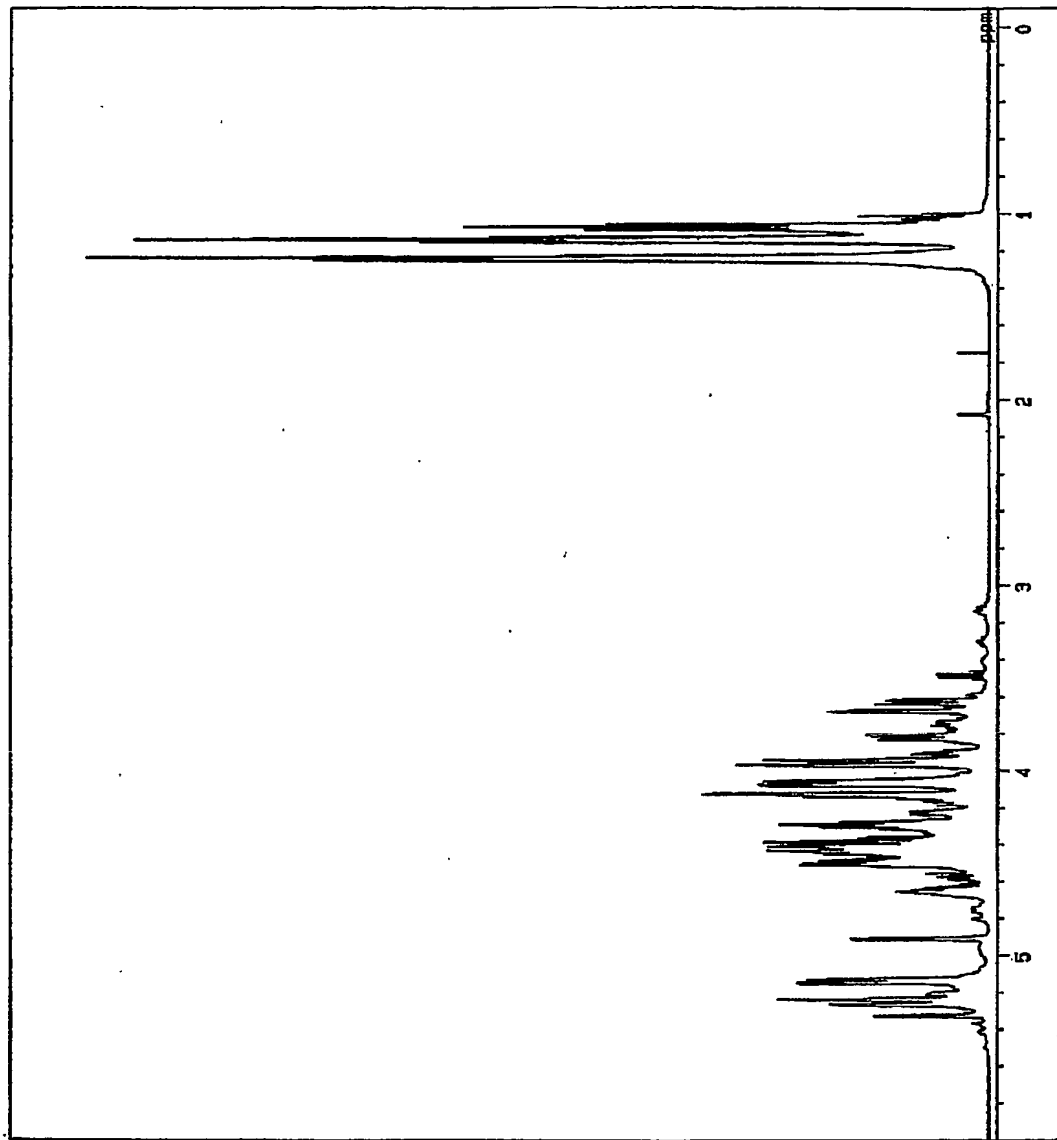
【図13】



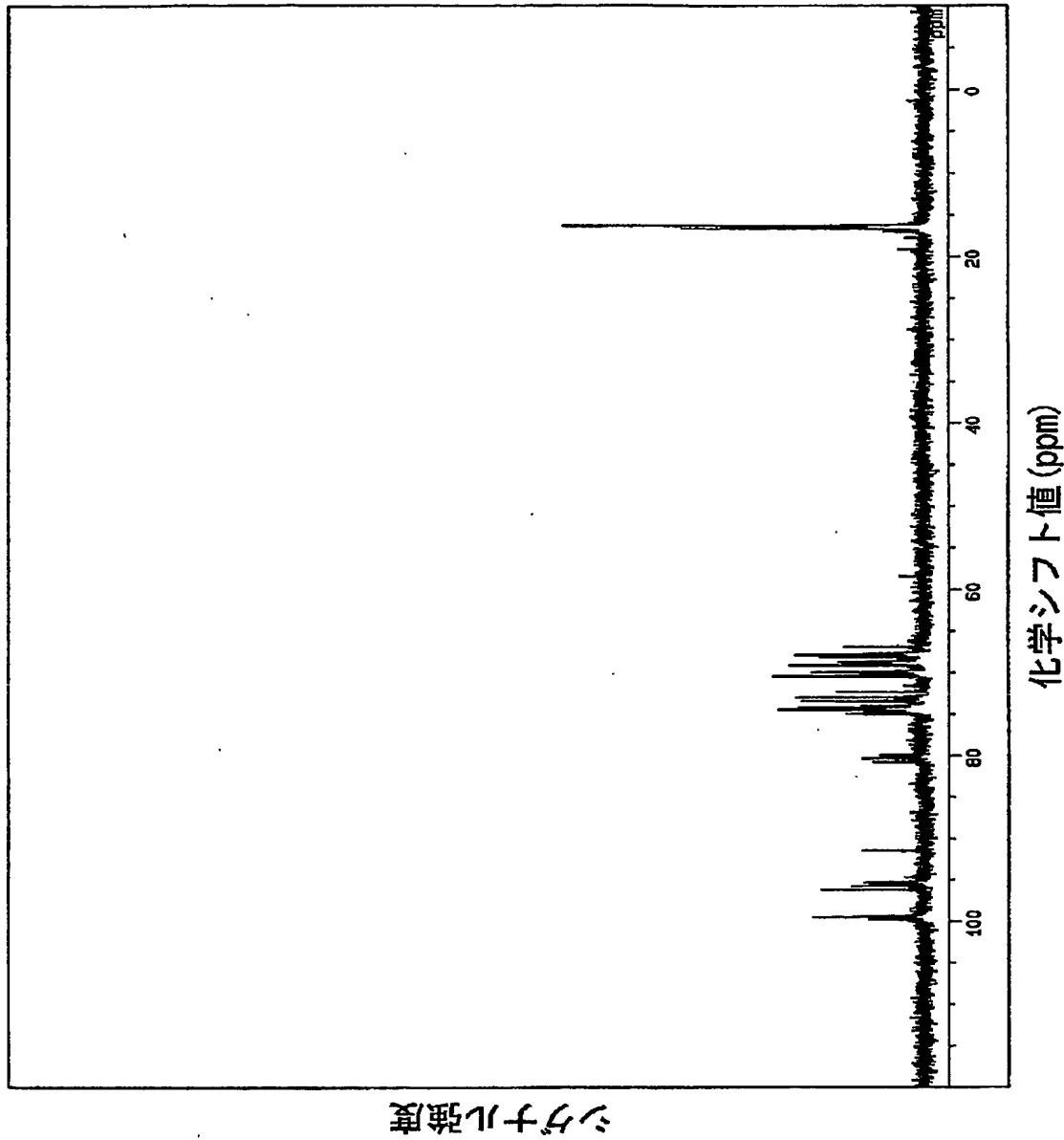
【图14】



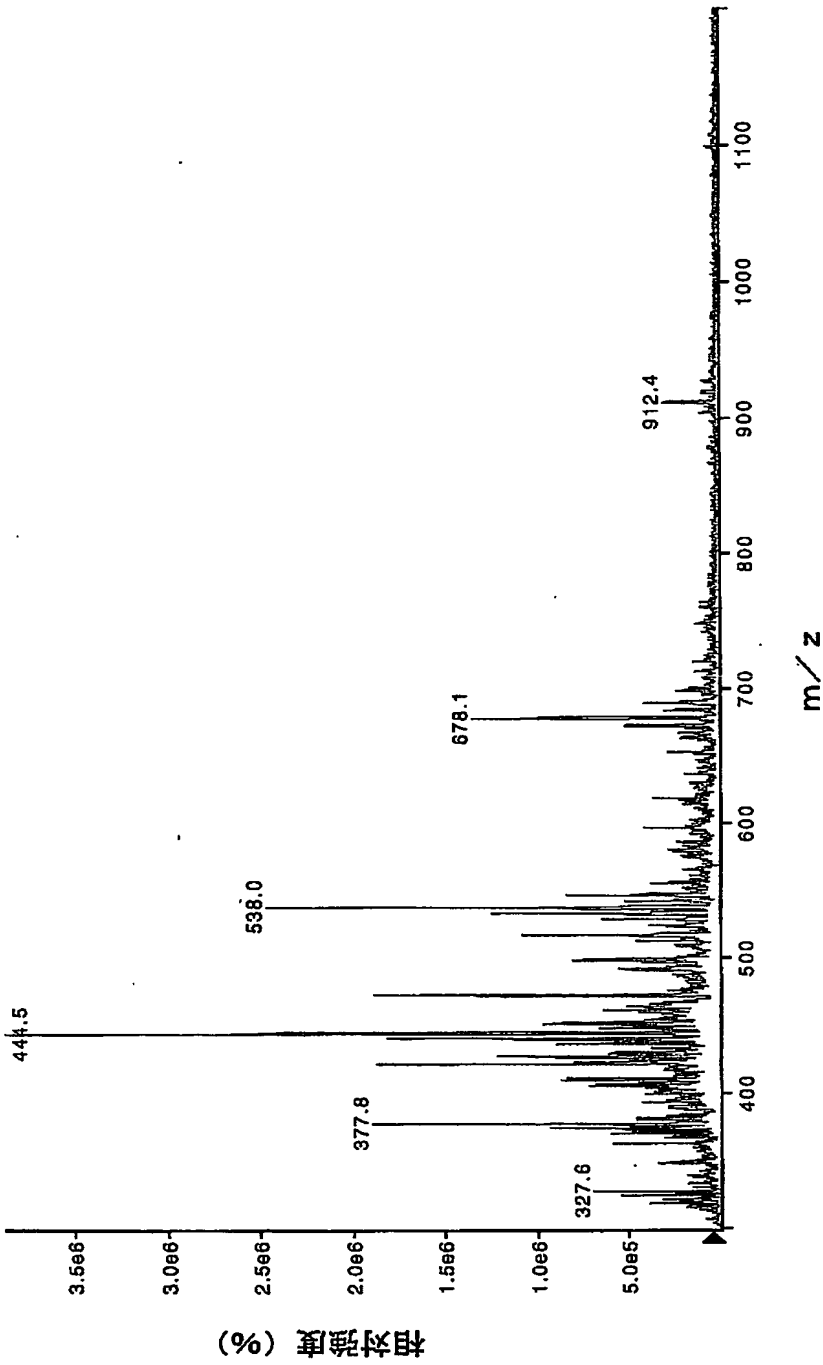
【図15】



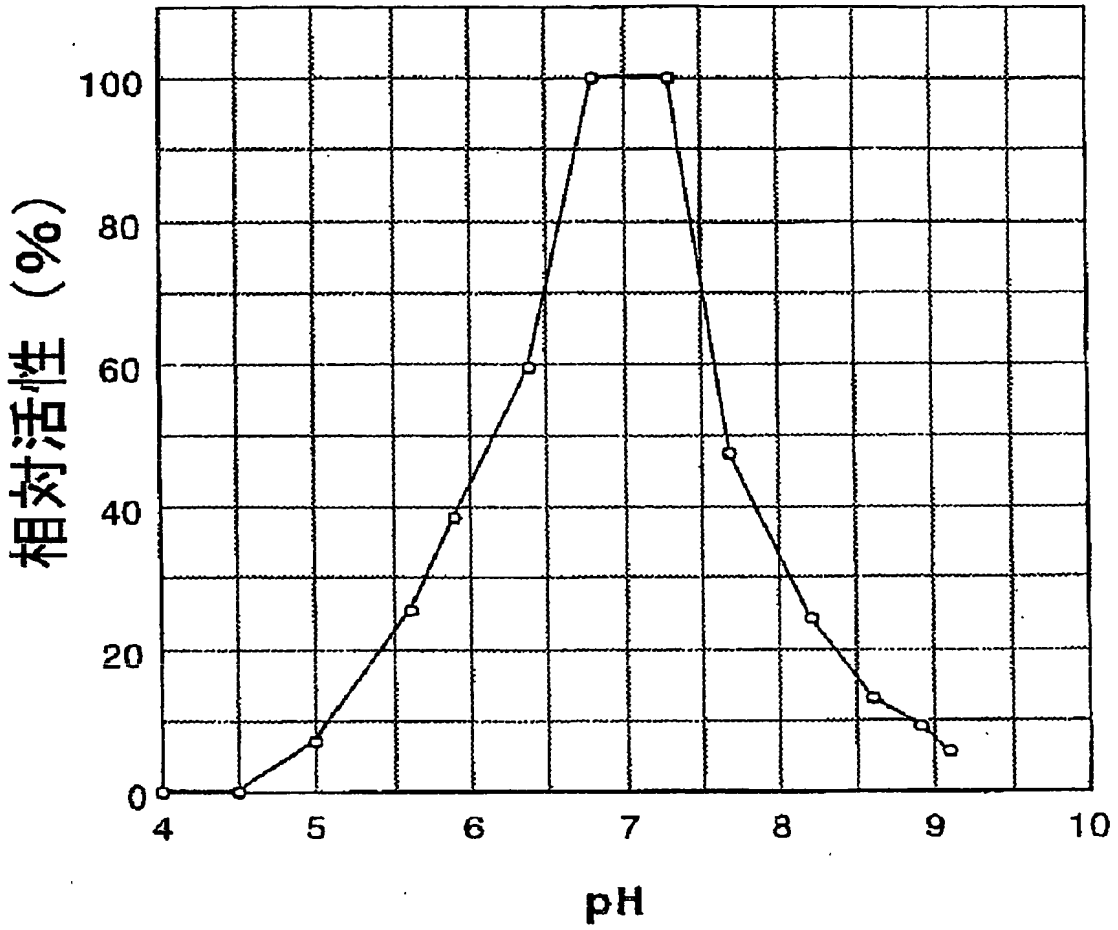
【図16】



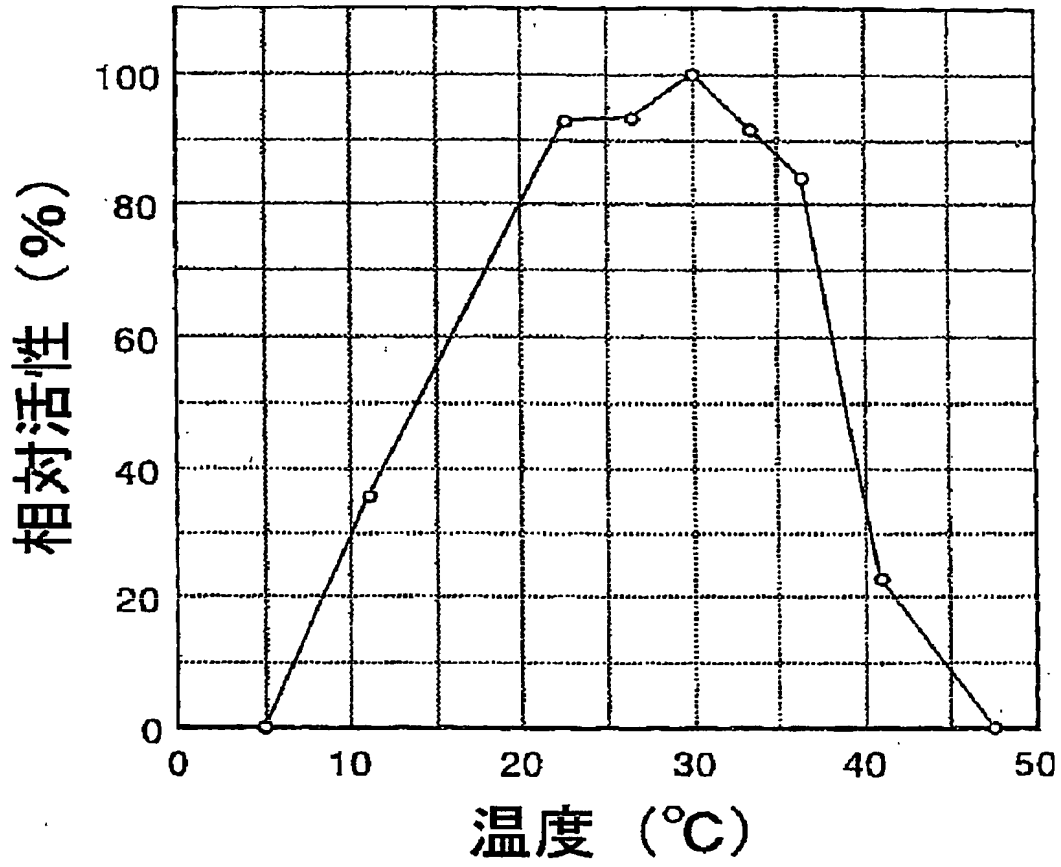
【图 17】



【图 18】



【图19】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 *Fucus vesiculosus* や *Ascophyllum nodosum* などのヒバマタ目褐藻類由来硫酸化フカンを分解する糖鎖工学的に有用な酵素、該酵素の製造方法、及び硫酸化フカンに該酵素を作用させて得られるオリゴ糖及びその製造方法を提供すること。

【解決手段】 *Fucus vesiculosus* や *Ascophyllum nodosum* などのヒバマタ目褐藻類由来硫酸化フカンを分解する糖鎖工学的に有用な酵素、該酵素の製造方法、及び硫酸化フカンに該酵素を作用させて得られるオリゴ糖及びその製造方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [302019245]

1. 変更年月日 2002年 4月 1日
[変更理由] 新規登録
住 所 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
氏 名 タカラバイオ株式会社